

На правах рукописи

РОЖКОВАН
КОНСТАНТИН ВАСИЛЬЕВИЧ

**Молекулярная эволюция 18S рДНК и генетическое разнообразие
осетров Амура *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и *Huso dauricus*
(Georgii, 1775)**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

Работа выполнена в Биолого-почвенном институте Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Челомина Галина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Брыков Владимир Алексеевич
доктор биологических наук, профессор
Подгорная Ольга Игоревна

Ведущая организация: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится “14” ноября 2008 г. в “10” часов на заседании диссертационного совета Д005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Факс: (4232) 310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан “ ___ ” ноября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Отряд *Acipenseriformes* (осетры и веслоносы) – древняя группа рыб, ведущая свое происхождение из Юрского Периода (Grande, Bemis, 1991). Осетры и их ближайшие филогенетические родственники веслоносы считаются живыми ископаемыми, поскольку за последние 200 млн лет своего существования они не подверглись крупным морфологическим изменениям (Gardiner, 1984). Широкое использование этой группы в коммерческих целях привело к масштабному вылову осетровых, что отразилось на значительном уменьшении их численности. В настоящее время все представители рода *Acipenser* включены в списки Международной конвенции по редким видам (CITES). Генетические исследования обнаружили, что кариотипическая эволюция осетровых рыб сопровождалась ограниченным числом изменений в хромосомах (Birstein et al., 1997). Скорость молекулярной эволюции осетров на уровне белков, последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК тоже оказалась пониженной (Brown et al., 1996; Birstein et al., 1997), что ассоциируется с недавней дивергенцией этой группы (Choundhury, Dick, 1998). Недавнее открытие у видов *Acipenser* (Krieger, Fuerst, 2002, 2004; Krieger et al., 2006) множественных копий ядерного гена 18S рРНК делает осетров уникальной группой среди позвоночных. Все осетровые являются полиплоидами ($4n-8n-16n$) и обладают большим (120-500) числом хромосом (Birstein et al., 1993; Blackledge, Bidwell, 1993). Эти факторы, возможно, явились причиной относительно простой межвидовой и межродовой гибридизации, усугубляемой перекрытием зон нереста. Гибридизация делает систематику *Acipenseridae* весьма запутанной (Birstein, 2002). Статус редких видов, высокий эволюционный возраст, особенности морфологической и молекулярной эволюции делают эту группу особенно привлекательной для всестороннего изучения, и прежде всего – для ее сохранения в природе во всем генетическом разнообразии.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование особенностей молекулярной эволюции и механизмов формирования генетического разнообразия у амурского осетра, калуги и их гибридов как основы сохранения генофонда аборигенных видов. Основные задачи исследования:

1. Дать оценку генетического разнообразия осетровых рыб Амура из природных популяций и полученных при искусственном разведении, включая межвидовые гибриды, с помощью мультилокусных RAPD-PCR-маркеров;
2. Клонировать и секвенировать участок гена 18S рРНК амурского осетра, калуги и межвидовых гибридов (*A. schrenckii* × *A. baerii* и *A. schrenckii* × *H. dauricus*), а также полную последовательность 18S рДНК амурского осетра;
3. Провести детальный анализ полиморфизма, дивергенции, функциональной значимости и филогенетических связей клонированного участка гена 18S рРНК осетровых рыб Амура и их гибридов;
4. По результатам секвенирования полной последовательности 18S рДНК амурского осетра и данным из Genbank провести анализ филогенетических связей амурского осетра с другими видами осетровых рыб.

Научная новизна. Практически все полученные в работе результаты являются новыми и приоритетными. Впервые выполнено сравнительное исследование генетической изменчивости двух видов осетровых рыб из природных популяций Амура; дан анализ особенностей наследования RAPD-локусов в F₁ генерации межвидовых гибридов: геномы

гибридов содержат часть признаков обоих родителей, а также гибридно-специфичные локусы, отсутствующие в геномах родительских видов; наследование некоторых признаков зависит от направления скрещивания. Впервые клонирована и секвенирована полная последовательность ядерного гена 18S рРНК амурского осетра, проведены ее структурно-функциональный и филогенетический анализы. Впервые клонированы и секвенированы 486 пн участки 18S рДНК амурского осетра, калуги, гибридов амурского осетра с калугой и с сибирским осетром. Показаны множественность аллелей этих генов у дальневосточных видов осетровых рыб и повышение генетического разнообразия рДНК при межвидовой гибридизации. Доказано существование среди аллельных вариантов функциональных последовательностей 18S рДНК и последовательностей, эволюционирующих под ослабленным селективным давлением. Даны высокие оценки шанса выживания осетровых рыб Амура, при условии отсутствия антропогенного пресса; обнаружение в природных популяциях межвидовых гибридов рассматривается как один из факторов риска. RAPD маркеры признаны полезными для генетического мониторинга природных популяций осетровых рыб Амура в целях сохранения их генофонда.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты важны для понимания общих закономерностей формирования гибридного генома, эволюционной судьбы дублированных генов, а также механизмов генерирования и поддержания генетического разнообразия у полиплоидных видов животных в целом. Уточнение филогенетических связей осетров Амура является вкладом в разработку систематики и филогении *Acipenseriformes*. Поскольку осетры имеют большой экономический интерес, молекулярные данные могут быть использованы для сертификации коммерческих продуктов. В связи со статусом редких видов, данные об особенностях генетического разнообразия осетров Амура крайне необходимы для разработки эффективных мер по их сохранению и рациональному природопользованию.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 5 статей в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 209 страницах, иллюстрирована 18 таблицами и 54 рисунками. Список литературы включает 316 наименований, из них 276 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использован материал по четырем видам (*A. schrenckii*, *A. baerii*, *A. ruthenus*, *Huso dauricus*) и межвидовым гибридам (*A. schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus*, *A. ruthenus* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *H. dauricus*) осетровых рыб из реки Амур и из маточных стад Лучегорской научно-исследовательской станции ТИНРО-Центра.

ДНК выделяли из крови и фиксированной в 80% этаноле печени стандартным фенольно-детергентным способом (Маниатис и др., 1984). Оценку качества полученных препаратов ДНК и выравнивание концентрации для PCR проводили электрофоретически, используя 1% агарозный гель и ДНК фага лямбда известной концентрации.

Внутрипопуляционная генетическая изменчивость вычислялась по ряду параметров: n_a – наблюдаемое и n_e – эффективное число аллелей на локус (Kimura, Crow, 1964); P и P_{95} – доля полиморфных локусов без критерия и с 95% критерием полиморфизма; $H_{e_{un}}$ –

теоретически ожидаемая гетерозиготность с поправкой на величину выборки (Stephanes et al., 1992); I – индекс гетерогенности выборки Шеннона-Вивера (Shannon, Weaver, 1949). Генетическая дифференциация выборок оценивалась по Dun – несмещенным генетическим дистанциям (Nei, 1972); Dst – межпопуляционному генному разнообразию и Gst – коэффициенту генных фиксации (Nei, 1975); Nm – числу мигрантов на поколение (Wright, 1951); и $Exact\ test$ – точному тесту на дифференциацию популяций включая χ^2 , df и p (Raymond, Rousset, 1995). Расчёт генетических параметров осуществляли с помощью программ PopGen 32 (Yeh, Boyle, 1997), NTSYS (Rohlf, 1992) и TFGPA (Miller, 1997).

Для амплификации 486 пн участка гена 18S рРНК использовали универсальные праймеры: прямой – 5'-ТСААГААСГАААГТССГГАГГ, обратный – 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA. Амплификация полноразмерного гена малой рибосомной субъединицы (около 1800 пн) осуществлялась с использованием праймеров, разработанных для *A. fulvescens* (Krieger, Fuerst, 2002) и применением Long PCR Enzyme Mix (Fermentas). После амплификации продукты осаждали спиртом и растворяли в 20 мкл TE буфера. Клонирование проводили по липким концам с использованием InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). Секвенирование осуществляли на автоматическом лазерном секвенаторе ABI Prism 310 на базе БПИ ДВО РАН.

Анализ полиморфизма последовательностей рДНК, характера мутационных замен и тесты на нейтральность проводили с помощью программ DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003) и Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). Реконструкции филогенетических связей выполнены посредством кластерного анализа невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA), методом ближайшего связывания (NJ), и построением минимального спеннинг-древа (MST) на основе попарных генетических дистанций Нея с использованием программ TreeConw (Van de Peer, De Wachter, 1994), TFGPA (Miller, 1997), MEGA 4 (Tamura, Dudley, Nei, Kumar, 2007) и NTSYS (Rohlf, 1992). Филогенетическую модель определяли с помощью Modeltest (Posada, Grandall, 1998). Многомерное шкалирование (MDS) выполняли в программе NTSYS (Rohlf, 1992) для установления основных дивергентных групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия межвидовых гибридов амурского осетра, полученных при искусственном скрещивании

RAPD-спектры анализируемых видов осетровых рыб обычно демонстрировали достаточно высокую видоспецифичность. Например, для праймера ОРА-18 таксонспецифичными в геномах *A. schrenckii*, *A. baerii* и *A. ruthenus* были фрагменты длиной 1140 и 1030 пн, блок фрагментов в диапазоне 1000-870 пн, и 420 пн фрагмент, соответственно (рис. 1).

У гибридов RAPD паттерны оказались более похожими между собой, чем с родительскими видами. Их особенности могут быть обобщены следующим образом: 1 – содержание маркерных фрагментов ДНК обоих родителей (Рис. 2 а), что ожидаемо в F_1 генерации для локусов, наследуемых в соответствии с законами Менделя; 2 – появление дополнительных фрагментов, отсутствующих у родителей (рис. 2 б); наличие этих зон у гибридов менее предсказуемо; 3 – зависимость наследования некоторых зон от направления скрещивания; аналогичные данные по другим видам не известны (рис. 2 в, г).

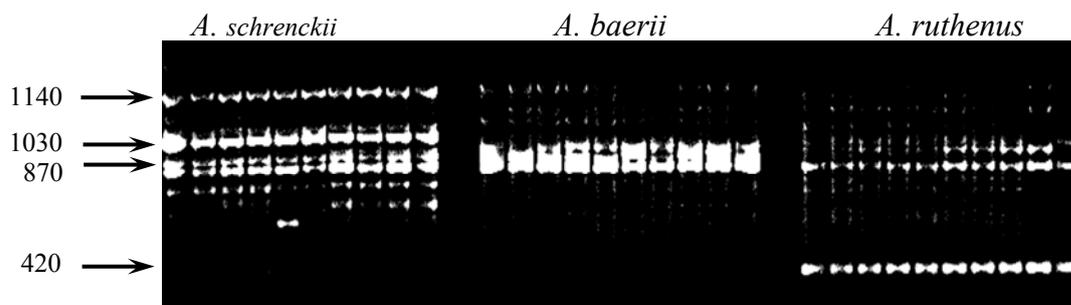


Рис. 1. RAPD паттерны трех видов осетров, генерируемые праймером OPA-18

Всего в анализируемой выборке из 70 особей идентифицировано 252 локуса. Основные показатели генетической изменчивости (P , I , Hun) были выше в объединенной выборке родительских видов, по сравнению с их гибридами. Однако когда сравнивали каждый родительский вид с каждым типом гибридов, показатели гибридов оказывались выше.

Чтобы установить уровень генетической дифференциации между видами осетров и их гибридами, использовали разные подходы (см. методы). Все они указали на более высокую дифференциацию видов по сравнению с гибридами, а также на существенную дифференциацию между гибридами и их родителями.

Для визуализации генетической дифференциации осетров на основные группы было использовано многомерное шкалирование основанное на результатах попарных генетических дистанций (рис. 3).

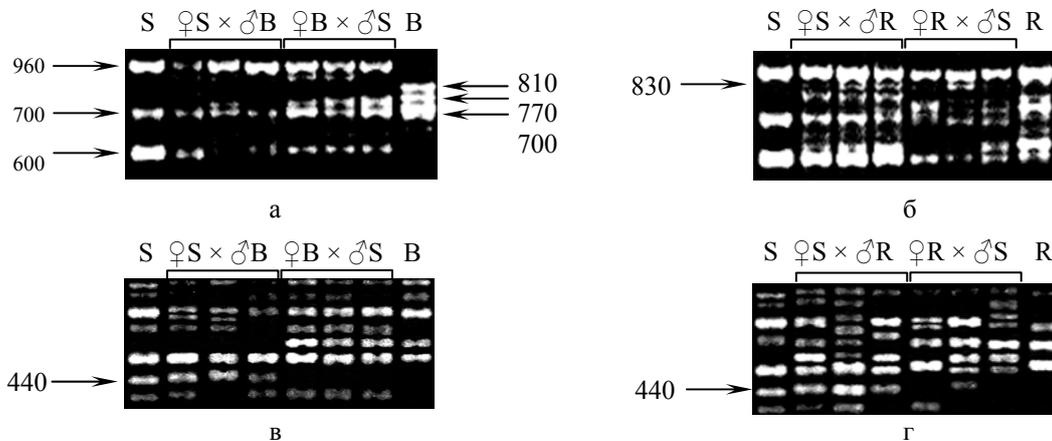


Рис. 2. Примеры RAPD полиморфизма осетров, выявленные с помощью праймеров OPC-09 (а, б) и OPF-08 (в, г). S – *Acipenser schrenckii*, B – *A. baerii*, R – *A. ruthenus*. Стрелками указаны маркерные фрагменты ДНК.

Полученные данные продемонстрировали хорошее разделение сравниваемых видов и их гибридов в пространстве трех координат; причем, эффективно разделились даже гибриды от разных направлений скрещивания.

Филогенетические NJ деревья со 100% бутстреп-поддержкой распределяют всех анализированных особей в разные кластеры согласно их видовой принадлежности; гибриды каждого типа скрещиваний образуют собственные кластеры. UPGMA дендрограммы генетического сходства разделяют сравниваемые формы менее эффективно.

Таким образом, мы показали, что метод RAPD-PCR пригоден для идентификации гибридного потомства амурского осетра со стерлядью и сибирским осетром. Это важно,

т.к. первая генерация гибридов у осетров не всегда является морфологически промежуточной по отношению к родительским видам, а морфологическая “промежуточность” – не всегда показатель межвидовой гибридизации (Tranah et al., 2004).

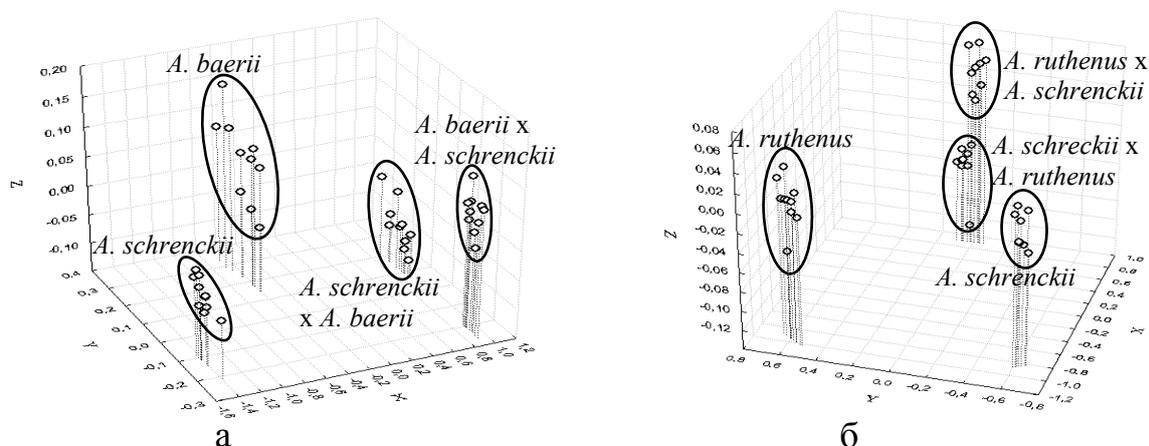


Рис. 3. Многомерный анализ генетического разнообразия осетров (а – амурский и сибирский осетры, гибриды амурского и сибирского осетров; б – амурский осетр и стерлядь, гибриды амурского осетра и стерляди)

Межвидовая гибридизация имеет широкие последствия; она может привести к хромосомным перестройкам, активизации мобильных элементов, изменениям метилирования ДНК и генной экспрессии и т.д. (Adams, Wendel, 2005). Множество исследований указывают, что гибридизация может повышать генетическую изменчивость и генерировать новые признаки или их комбинации (н-р, Goldman et al., 2004; Mandak et al., 2005). В этом плане осетровые рыбы не являются исключением: полученные нами данные свидетельствуют о повышенной изменчивости гибридов по сравнению с исходными видами, и появлению у них новых признаков (фрагментов ДНК).

Тем не менее, в целом уровень генетической изменчивости в проанализированных нами выборках, как родителей, так и гибридов, не может быть признан высоким, что, видимо, обусловлено искусственным разведением рыб от ограниченного числа родителей. Изменения показателей генетической изменчивости осетров при объединении популяционных выборок вполне закономерны.

Теоретически, пloidность может влиять на уровень генетической изменчивости видов (Ludwig et al., 2001). Однако нами не выявлено предполагаемых отличий в уровне генетической изменчивости между *A. ruthenus* (n = 118) и *A. schrenckii* (n = 240) с *A. baerii* (n = 248). Такой результат, прежде всего, указывает на необходимость использования статистически значимых выборок. Вместе с тем, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о непрерывном процессе функциональной редукции уровня пloidности у осетров (Ludwig et al., 2001), что, видимо, может в целом отражаться на их генетической изменчивости. Весьма примечательно, что появление разного количества новых признаков (фрагментов ДНК) у гибридов между равно- и разнохромосомными видами согласуется с имеющимися данными о прекопуляционных изолирующих механизмах, которые лучше развиты между видами осетров, менее всего отличающимися по числу хромосом (Васильев, 1985). Зависимость RAPD паттернов от направления скрещиваний можно объяснить опосредованным влиянием пол-специфичных локусов; связь с полом двух аллозимных локусов была описана для радужной форели (Allendorf et al., 1974). Такие пол-

связанные маркеры полезны для получения информации о возможных случаях гибридизации в недавнем прошлом (Allendorf, Waples, 1996).

Дискриминация межвидовых гибридов в природных популяциях осетровых рыб Амура

Для оценки уровня генетического разнообразия природных популяций осетровых рыб Амура мы использовали RAPD-PCR анализ. В общей выборке выявлено 173 локуса. При визуальном анализе спектры, полученные для видовых выборок, имели высокую степень сходства. Наилучшие картины межвидовой дифференциации были получены с помощью праймеров ОРА-09, ОРА-10, ОРА-11 и ОРА-17. Например, локус ОРА-10₃₂₀ является специфичным для *A. schrenckii*, у *H. dauricus* он отсутствует, а локус ОРА-10₄₆₀ имеет выраженные частотные отличия между сравниваемыми видами (рис. 4). Надежных маркеров (гибрид-специфичных фрагментов ДНК) для идентификации фенотипических гибридов осетровых рыб р. Амур выявлено не было.

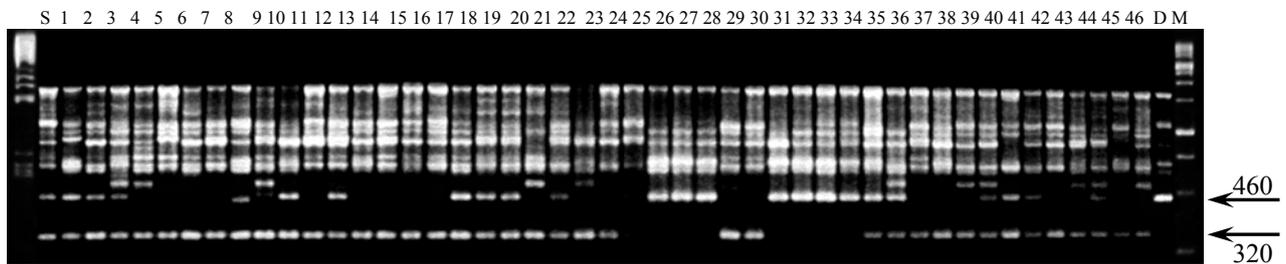


Рис. 4. RAPD паттерны осетров Амура, генерируемые праймером ОРА-10. S – *A. schrenckii*, D – *H. dauricus*, M – маркер.

Выборки амурского осетра *A. schrenckii* и калуги *H. dauricus* оказались высоко полиморфными, введение 95% критерия существенно не повлияло на показатель полиморфизма амурского осетра (табл. 1), что свидетельствует о малочисленности редких аллелей у RAPD локусов. Значения других параметров генетической изменчивости для каждой из видовых выборок также оказались достаточно высокими (см. табл. 1); различия между видами обусловлены неравными объемами выборок (из-за низкой численности калуги).

Таблица 1. Параметры генетической изменчивости амурского осетра и калуги

Выборки	<i>N</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>I</i>	<i>P</i> , %	<i>P</i> ₉₅ , %	<i>Hun</i>
<i>A. schrenckii</i> (n=37)	165	1.71	1.44	0.38	71.1	65.9	0.26
<i>H. dauricus</i> (n=9)	167	1.58	1.38	0.32	58.4		0.23

N – число локусов; *na*, *ne*, *I*, *P* и *Hun* – как в материалах и методах.

Наиболее эффективным для дискриминации видов оказался Exact test ($p = 0.0$), а для гибридов с видами (дивергировавших значительно слабее, чем виды) – генетические дистанции и коэффициент генных фиксации. При анализе амурских осетровых рыб методом многомерного шкалирования особи распределились в две основные группы. В одну группу вошли все экземпляры калуги, в другую – амурского осетра; фенотипические гибриды расположились между калугой и амурским осетром (рис. 5).

Данные кластерного анализа, полученные методами NJ и UPGMA, в целом, согласуются с данными многомерного шкалирования; отличия связаны с локализацией

гибридов. На NJ-дерево фенотипические гибриды входят в кластер амурского осетра (базальная ветвь), а на дендрограмме UPGMA – калуги (самостоятельная ветвь). MST демонстрирует четкую дифференциацию видов, которые соединяются между собой через фенотипические гибриды. Примечательно, что эта реконструкция указывает на гетерогенность популяции *A. schrenckii*, предполагая у него наличие, по крайней мере, двух генетически дискретных групп.

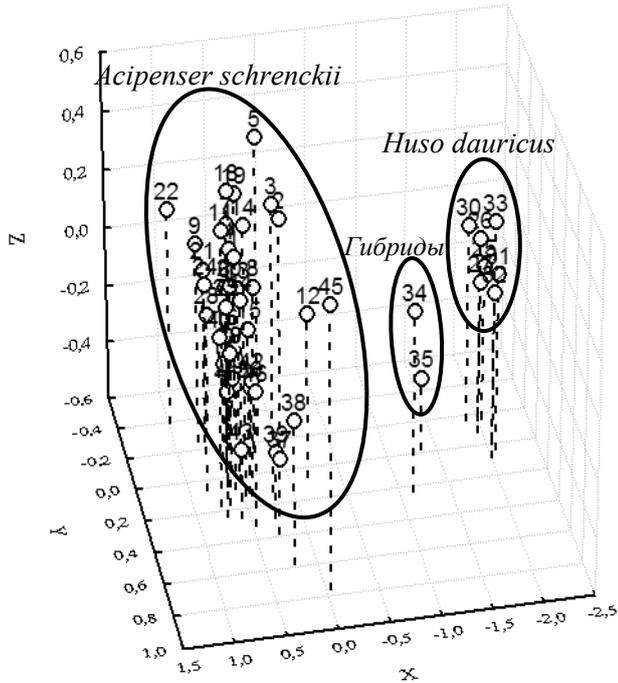


Рис. 5. Многомерный анализ генетического разнообразия осетров

Исследование изменчивости RAPD-маркеров позволяет сделать вывод, что осетровые виды рыб бассейна р. Амур имеют достаточно высокий уровень генетического разнообразия. По сравнению с показателями генетического разнообразия осетров Лучегорской научной станции, изменчивость природной популяции выше на порядок и сопоставимы с таковыми у массовых видов позвоночных (Спиридонова и др., 2005; Атопкин и др., 2007).

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 5 лет, позднее созревание (после 10-15 лет) иногда с существенной временной разницей между

полами (в некоторых речных системах самцы созревают быстрее самок) (н-р.: Крыхтин, 1986; Grunwald et al., 2002). Такие особенности ведут к генетическому “эффекту сохранения”, который заключается в сохранении стабильного сосуществования видов в постоянно меняющейся среде (Cáceres, 1997).

Эффективность статистических методов в дискриминации межвидовых гибридов продемонстрирована в ряде исследований (н-р.: Congiu et al., 2001; Цвирка и др., 2006). В данной работе высокая статистическая поддержка видовых кластеров получена только для NJ дерева; в UPGMA реконструкциях она значительно ниже. Возможной причиной этому, может быть наличие в исследуемой популяционной выборке отдаленных гибридов между осетровыми видами рыб. Поэтому для прояснения ситуации в дальнейшем мы планируем использование 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, экологические загрязнения, а также инвазия искусственно разводимых рыб требует постоянного генетического мониторинга для сохранения генофонда аборигенных популяций осетровых рыб бассейна р. Амур.

Мультилокусные RAPD-PCR маркеры в сочетании со статистическими методами могут быть для этого удобным и надежным инструментом.

Анализ генетического разнообразия последовательностей 18S рДНК амурского осетра и калуги

Всего для двух видов, амурского осетра *A. schrenckii* и калуги *H. dauricus*, изучено 60 клонов с 486 пн вставкой гена ядерной 18S рРНК. Максимальное количество клонов и гаплотипов (аллельных вариантов) от одной особи составило 30 и 12, соответственно. Наши данные продемонстрировали высокое генетическое разнообразие клонированных последовательностей осетров Амура, сопоставимое с таковым северо-американского озерного осетра *A. fulvescens* (табл. 3, рис. 6).

Среди 22 клонов амурского осетра обнаружено 11 аллельных вариантов гена ядерной 18S рРНК, имеющих различия по 21 замене и 1 делеции. Из 38 клонов калуги выделено 13 вариантов последовательности, различающихся по 14 заменам и 11 делециям. Некоторые отличия оказались таксон-специфичными (рис. 7).

Таблица 3. Полиморфизм последовательностей 18S рДНК трех видов осетровых рыб

Вид	n	S	h	Hd	Pi	k
<i>A. fulvescens</i> *	18	31	12	0.935	0.01138	5.510
<i>A. schrenckii</i>	22	20	11	0.714	0.00878	4.251
<i>H. dauricus</i>	38	13	16	0.863	0.00979	4.649
В целом	78	44	34	0.871	0.01123	5.335

* – здесь и далее – данные GenBank. n – число клонов, S – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов, h – число гаплотипов, Hd – аллельное разнообразие, Pi – нуклеотидное разнообразие, k – среднее число нуклеотидных различий.

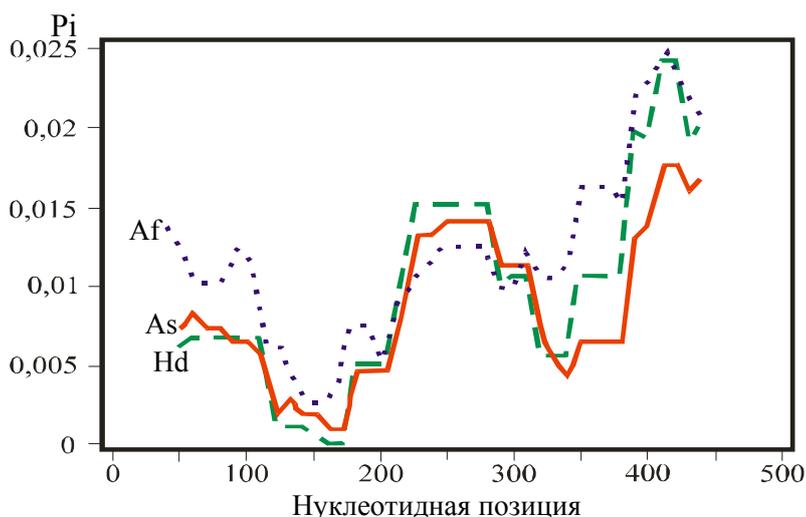


Рис. 6. Распределение нуклеотидного разнообразия рДНК у трех видов. Pi – нуклеотидное разнообразие, Af – *Acipenser fulvescens*, As – *Acipenser schrenckii*, Hd – *Huso dauricus*.

Примечательно, что характер распределения нуклеотидного разнообразия вдоль исследованного фрагмента рДНК у осетров Амура такой же, как у североамериканского озерного осетра, включая консервативную область между 100 и 200 нуклеотидными позициями (см. рис. 6).

Тесты на дифференциацию показали, что основная часть аллельного и нуклеотидного разнообразия последовательностей рДНК (70-90%) приходится на внутривидовую компоненту. Уровень изменчивости аллельных вариантов гена 18S рРНК, оцененный с помощью индекса

генетических дистанций, у анализируемых видов практически не отличался и варьировал в широком диапазоне: 0.2-3.7% у *Acipenser schrenckii* и 0.2-3.5% у *Huso dauricus*. Хотя верхний предел генетических дистанций достаточно высок, он ниже межвидовых различий *Acipenseriformes* (примерно 5%), и почти такой, как у *A. fulvescens* (4%) (Krieger, Fuerst, 2002).

Таким образом, результаты исследований указывают, что феномен множественности аллелей ядерных генов 18S рРНК осетров распространяется и на дальневосточные виды; следовательно, механизмы согласованной эволюции у дальневосточных видов, подобно североамериканским, не реализуются в полной мере.

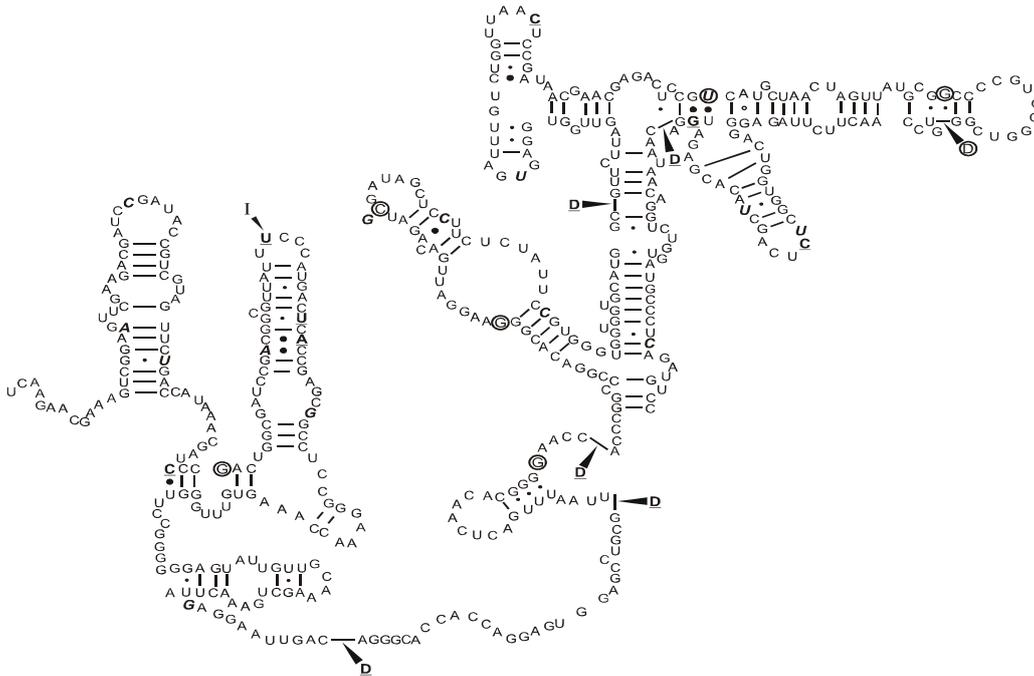


Рис. 7. Фрагмент вторичной структуры 18S рРНК *Polyodon spathula* (по: Krieger, 2000). Жирным курсивом обозначены мутации, специфичные для *A. schrenckii*, жирным подчеркнутым – для *H. dauricus*. Общие мутации обозначены кружком.

Точные причины высокой внутривидовой изменчивости 18S рДНК у осетров пока неизвестны. Полиплоидная природа генома осетров - наиболее вероятный фактор возникновения и поддержания множественности вариантов последовательности гена 18S рРНК по двум причинам. Гибридизация могла внести разные аллели от разных родителей, или аллополиплоидизация могла увеличить число хромосом, а также кластеров рДНК по сравнению с предковыми формами (Krieger, Fuerst, 2002, 2004). У растений, где полиплоидия широко распространена, в большинстве случаев внутривидовая изменчивость внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) в последовательностях рДНК ассоциирована с полиплоидией или множественностью ядрышкообразующих регионов (NOR) (Campbell et al., 1997). Гибридизацию, как причину разнообразия последовательностей 5.8S рДНК, называют исследователи коралла *Acropora* (Marquez et al., 2003). Возможно, существует причинная связь между размером генома и обилием копий генов; известно, что псевдогены у организмов с небольшим геномом удаляются быстрее относительно накопления мутаций (Petrov, 2001).

Разнообразие последовательностей 18S рДНК у гибридов осетровых рыб

Поскольку существуют предположения, что реализация механизмов согласованной эволюции осложняется межвидовой гибридизацией, мы эту проблему рассмотрели на примере двух гибридов: *A. schrenckii* × *A. baerii* и *A. schrenckii* × *H. dauricus*.

Результаты показали, что гибриды, по сравнению с родителями, являются более полиморфными (табл. 4), причем их изменчивость повышается как за счет увеличения частоты мутаций в полиморфных сайтах родителей, так и за счет появления новых, гибрид-специфичных мутаций, отсутствующих в геномах родителей (рис. 8). Вместе с тем, характер распределения нуклеотидного разнообразия вдоль исследуемого фрагмента 18S рДНК у них сохраняется (рис. 9).

Таблица 4. Полиморфизм последовательностей 18S рДНК гибридов осетровых рыб

Таксоны	n	S	h	Hd	Pi	k
<i>A. schrenckii</i> × <i>H. dauricus</i>	26	42	21	0.978	0.01666	8.031
<i>A. schrenckii</i> × <i>A. baerii</i>	14	18	10	0.890	0.01258	6.088
В целом	40	50	29	0.955	0.01530	7.373

n – число клонов, S – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов, h – число гаплотипов, Hd – аллельное разнообразие, Pi – нуклеотидное разнообразие, k – среднее число нуклеотидных различий.

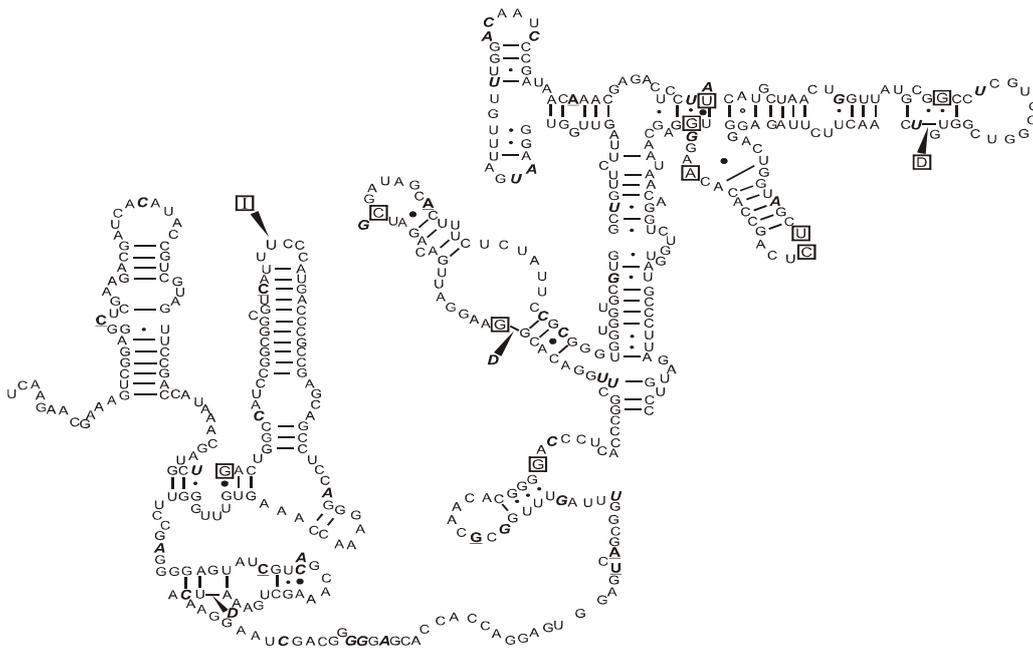


Рис. 8. Фрагмент вторичной структуры 18S рРНК *Polyodon spathula* (по: Kriger, 2000). Жирным курсивом обозначены мутации, специфичные для *A. schrenckii* × *H. dauricus*, жирным подчеркнутым – для *A. schrenckii* × *A. baerii*. Общие мутации обозначены квадратом.

Дифференциация гибридов с родительскими видами, а также между собой значительно ниже межвидовой дифференциации; согласно тесту AMOVA эти группы сравнения разделяют между собой >90% общего генетического разнообразия. Следовательно, механизмы согласованной эволюции действительно становятся менее эффективными при высоких потоках генов, обусловленных межвидовой гибридизацией.

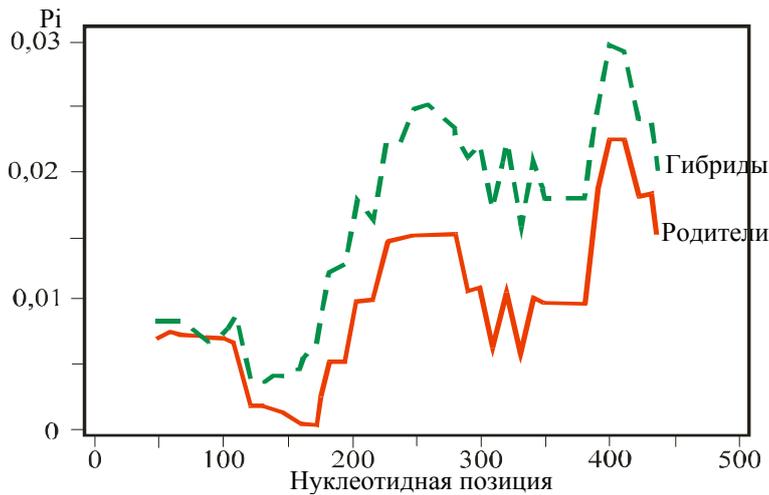


Рис. 9. Распределение нуклеотидного разнообразия рДНК у родителей и гибридов осетровых рыб.

2001; Woodruff, 1989). Межвидовая гибридизация – событие драматическое на геномном уровне и не изученное в должной мере, в особенности у полиплоидных видов животных, поэтому наши данные полезное дополнение к имеющимся сведениям.

Филогенетический анализ 486 пн последовательностей 18S рДНК осетровых рыб: гены или псевдогены?

Альтернативным источником внутригеномного полиморфизма рДНК может быть присутствие псевдогенных последовательностей, которые утрачивают свои функции, и как следствие имеют пониженные селективные ограничения и повышенную аккумуляцию мутаций. Недавно возможность присутствия псевдогенов 18S рДНК обсуждалось для североамериканских видов рода *Acipenser* (Krieger, Fuerst, 2002, 2004). В этой связи мы провели филогенетический анализ клонированных 486 пн последовательностей 18S рДНК. Отдельно сравнивали между собой виды, гибриды, и виды с гибридами. В каждом случае последовательности разделялись на две группы. Первая включала последовательности с высоким уровнем гомологии, вторая, гетерогенная, – более дивергированные последовательности, в которые входили функциональные гены и предполагаемые псевдогены 18S рДНК *A. fulvescens* (GenBank), соответственно. Поэтому, эти группы

последовательностей мы условно назвали “генами” и “псевдогенами”.

По разным критериям полиморфизм рДНК “псевдогенов” в группе видов в 3-10 раз выше, чем у “генов”; в группе гибридов эти различия составляли не более 40% (табл. 4). Распределение нуклеотидного разнообразия у “генов” и “псевдогенов” в группе родительских видов разительно отличается (рис. 10), причем изменчивость генов минимальна на

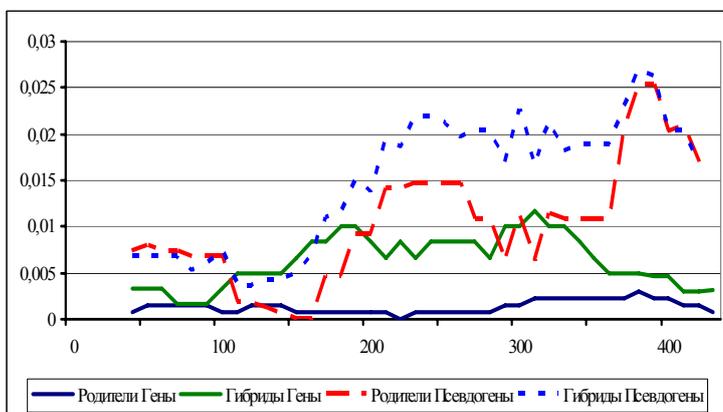


Рис. 10. Распределение нуклеотидного разнообразия у “генов” и “псевдогенов”.

всем отрезке анализируемого фрагмента, что свойственно функциональным генам. В группе гибридов эти различия заметно ниже. Дифференциация генов и псевдогенов существенно выше, чем дифференциация видов, или гибридов - они разделяют не >50% общего генетического разнообразия (тест AMOVA).

Анализ характера замен и тесты на нейтральность свидетельствуют о том, что “псевдогены” действительно испытывают меньшие селективные ограничения по сравнению с “генами” (табл. 5).

При анализе распределения мутаций по вторичной структуре участка гена 18S рРНК, мы обнаружили, что в спирали 27 (позиции 1103-1129 полноразмерного гена) “псевдогенов” имеются как нуклеотидные замены, так и делеция (рис. 11).

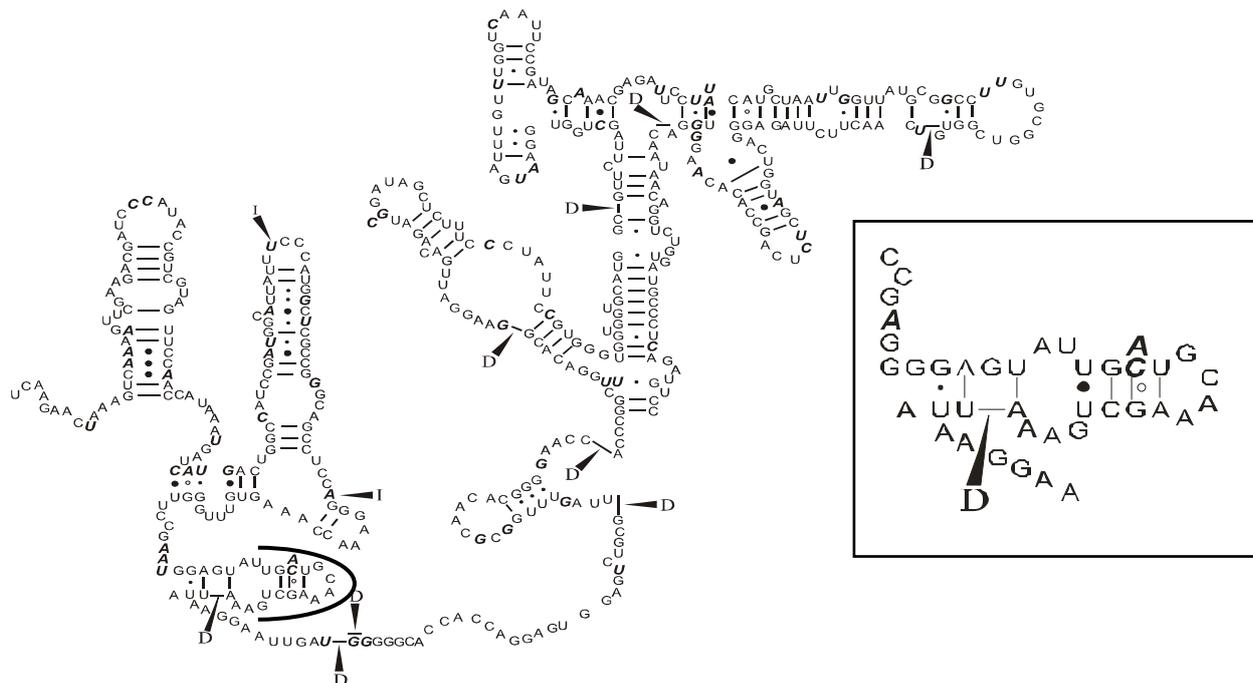


Рис. 11. Фрагмент вторичной структуры *Polyodon spathula* (по: Krieger, 2000). Жирным курсивом обозначены мутации для псевдогенов, D – делеция, I – инсерция. Спираль 27 отмечена дугой, в квадрате – увеличенное изображение H27.

Таблица 5. Характер нуклеотидных замен и тесты на нейтральность для генов и псевдогенов

Группа сравнения		ZnS	(C→T) + (G→A): Другие замены	La - Lb
Виды	Гены	0.182	1 : 2.5	-0.009159
	Псевдогены	0.082	1 : 1	(Z=2.326)
Гибриды	Гены	0.226	1 : 2	-0.010587
	Псевдогены	0.276	1 : 1.5	(Z=2.083)

ZnS – тест на нейтральность Келли; La и Lb – среднее наблюдаемое число замен на сайт (длины ветвей) кластеров A (гены) и B (псевдогены) в сравнении с общим предком, различия считаются достоверными при $Z > 1.96$.

По существующим литературным данным, спираль 27 является конформационным переключателем, отвечающим за точность трансляции, и выполняет функции межсубъединичного моста (Hoerter et al., 2004). Это делает ее ключевой структурой в динамике и функционировании рибосомы. Наличие делеции в конформационном

переключателе свидетельствует о нарушении его функциональности. Это дает основания предполагать потерю “псевдогенами” функциональной активности. У “генов” мутаций, влияющих на функционирование рибосомы, не обнаружено.

Таким образом, эта часть исследований подтверждает наличие в геномах осетровых рыб Амура различных по функциональной значимости копий ядерного гена 18S рРНК. Вместе с тем, по результатам анализа только участка гена нельзя сказать, какая последовательность является геном, а какая псевдогеном; для этого необходимо детальное исследование полноразмерного гена.

Псевдогены рРНК малой субъединицы рибосом найдены в разных организмах, от бактерий (Skamarov et al., 1995) до приматов (Brownell et al., 1983). Такие последовательности часто идентифицируются потому, что они усечены, или несут множественные замены и инсерции/делеции по сравнению с их функциональными двойниками. Теоретически, “псевдогенизация” – наиболее вероятная судьба большинства генных экстра-копий; более 90% вновь образованных копий гена деградируют до псевдогенов. Недавно пришли к убеждению, что наиболее общая судьба комплекса дублицированных генов должна быть ни в не-функциональности, ни в не-функциональности, а в суб-функционализации, которая определяется как часть функции (функций), первоначально выполняемой одиночным предковым геном между его дубликациями (Rodin, Riggs, 2003). Суб-функционализация может быть обеспечена мутационными процессами дубликации-дегенерации-комплементации, которые либо сохраняют дубликаты, как они есть, либо освобождают гены от селективных ограничений для дальнейшей эволюционной шлифовки субфункций (Lynch et al., 2001).

Эволюционную перспективу множественных копий 18S рДНК осетров Амура мы попытались прояснить с помощью филогенетического анализа, используя реконструкцию MST, требующую для построения минимальное число шагов (рис. 12). Филогенетический анализ, выполненный для шести видов осетровых рыб, распределил все последовательности рДНК в два кластера с 3 основными аллельными вариантами (А, В и С). Различия варианта А с вариантами В (1.9%) и С (1.5%) существенно выше различий между вариантами В и С (0.4%). Вариант А, составляющий основу первого кластера (32% проанализированных сиквенсов), включал 12 последовательностей *A. schrenckii*, 11 – *H. dauricus*, 1 – *A. sturio* и функциональные гены *A. fulvescens*. Варианты В и С были центральными во втором кластере; они объединяли 12% и 7% от общего числа последовательностей соответственно, причем вариант В представлен рДНК преимущественно амурских видов осетров, а С – североамериканских.

Дифференциация кластеров по гаплотипическому разнообразию невысока ($G_{st} = 0.122$), но по данным нуклеотидного разнообразия она существенна ($F_{st} = 0.629$), причем эти значения заметно выше оценок, полученных при сравнении видов. Анализ характера замен, тесты на нейтральность указывают, что вариант А действительно представлен главным образом функциональными генами, а варианты В и С – последовательностями, эволюционирующими под действием ослабленного давления (табл. 4). Логично предположить, что центральные последовательности вариантов В и С – наиболее вероятные “кандидаты” на суб-функционализацию, связанную с локальными адаптациями видов (которые более схожи у амурского осетра и калуги по сравнению с североамериканским озерным осетром). Обнаруженная подразделенность “псевдогенов”

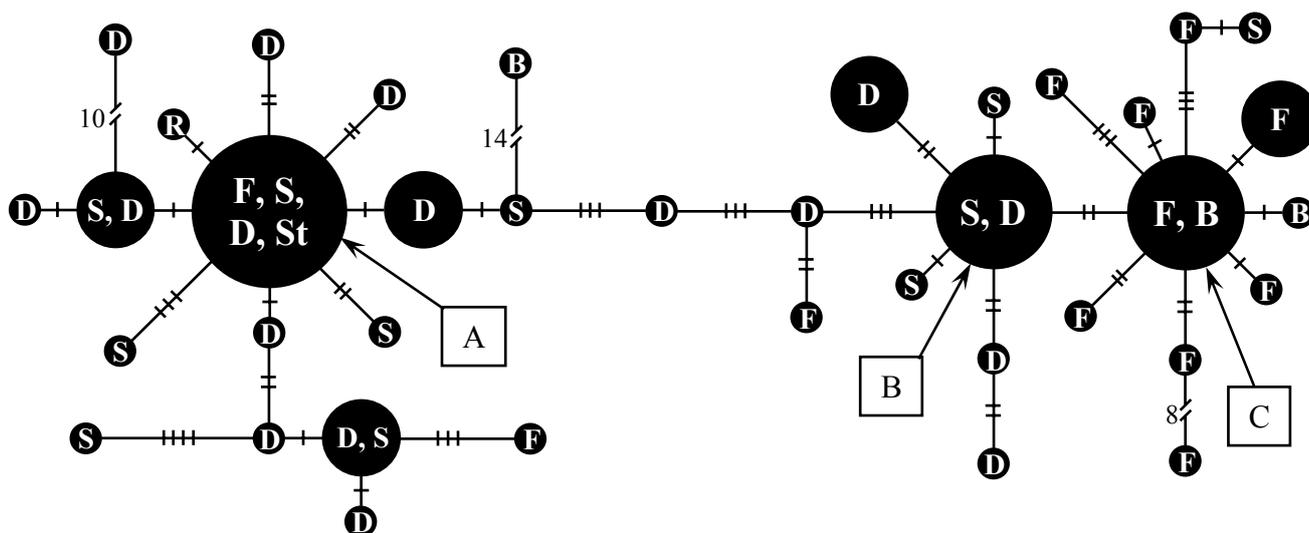


Рис. 12. MST-реконструкция последовательностей 18S рДНК шести видов осетровых рыб. S – *A. schrenckii*, R – *A. ruthenus*, F – *A. fulvescens*, B – *A. brevirostrum*, D – *H. dauricus*, St – *A. sturio*. Число штрихов и числа на соединяющих ветвях соответствуют количеству мутаций. Размер кружка пропорциональна количеству клонов.

дает основание предположить и альтернативное объяснение; оно заключается в том, что у осетров могут быть два функциональных варианта гена 18S рРНК, мажорный и минорный, что сближает их с другими изученными видами. Например, у кузнецика *Podisma pedestris* обнаружено две функциональные группы последовательностей рДНК и несколько псевдогенных (многие из которых транскрибируются), причем, только одна их функциональных групп представлена высоким числом копий (Keller et al., 2006). В любом случае, множественность копий рДНК придает виду эволюционную пластичность. И улучшение свойств функциональной последовательности такого гена, как 18S рРНК, и наличие разных функциональных последовательностей, является очень важным для адаптации вида в постоянно изменяющейся среде обитания. Возможно, отчасти по этой причине *Acipenseriformes* смогли сохраниться в течение многих миллионов лет, намного пережив фауну динозавров.

Филогенетические связи амурского осетра по данным полной последовательности 18S рДНК

Для анализа филогенетических связей амурского осетра с другими видами *Acipenseridae* нами было секвенировано 7 клонированных полноразмерных последовательностей 18S рДНК длиной 1746 п.н., у которых 486 нуклеотидные участки (позиции 960-1444 п.н. полноразмерного гена) были наименее изменчивы. Анализ распределения вставок и делеций относительно вторичной структуры 18S рДНК *Polyodon spathula* (Krieger, 2000), ближайшего филогенетического родственника видов *Acipenser*, подтвердил наличие у *A. schrenckii* 6 “горячих точек”, т.е. сайтов со вставками/делециями во всех проанализированных последовательностях, выявленных ранее у *Acipenseriformes* в пределах двух участков 18S рДНК общей длиной 788 п.н. (Krieger et al., 2006). Все без исключения “горячие точки” находятся в вариабельных областях молекулы 18S рРНК. Кроме того, нами обнаружена специфичная для *A. schrenckii* вставка аденина после

позиции 658 п.н., не вошедшая в исследованный ранее участок (табл. 6). Данный признак может быть полезен в дальнейшем для таксономической идентификации амурского осетра.

Таблица 6. Распределение инсерций и делеций в полноразмерных копиях гена 18S рРНК осетровых рыб

Вид	Нуклеотидная позиция ¹						
	53	265	658	771	840	1366	1696
Af*	+	+		+	+	+	+
As	+	+	+	+	+	+	+

¹Позиции пронумерованы согласно последовательности *P. spathula* (AF188371). Инсерции выделены жирным, делеция – курсивом. Для инсерций номер позиции предшествует мутации. Знак “+” обозначает присутствие мутации; родоспецифичные мутации подчеркнуты. Af* – *A. fulvescens*, As – *A.*

schrenckii (данные GenBank) (рис. 13). сайтами) анализируемых вариантов 18S рРНК, что предполагает сохранение ими функциональной значимости. Наибольшую важность среди функциональных доменов представляет спираль 27 (H27). Мутационный профиль 18S рДНК *A. schrenckii* имеет выраженное сходство с таковым *A. fulvescens* (данные GenBank) (рис. 13).

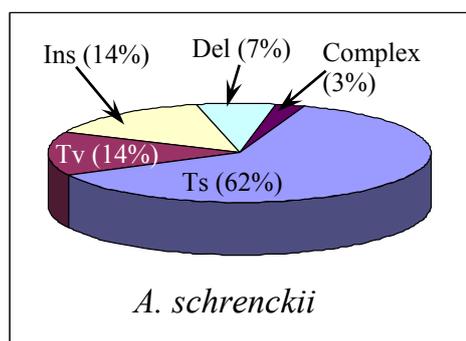
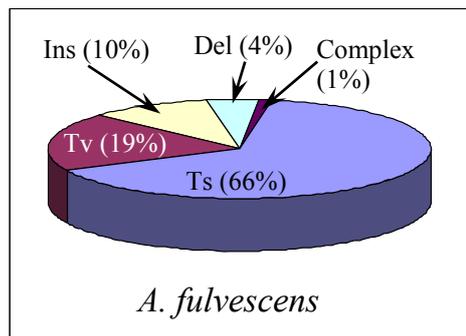


Рис. 13. Мутационный профиль 18S рДНК озерного (GenBank) и амурского осетров. Ts – транзиции, Tv – трансверсии, Ins – вставки, Del – делеции, Complex – мутации, затрагивающие более трех нуклеотидов.

Используя модель вторичной структуры 18S рРНК американского веслоноса *Polyodon spathula* (Krieger, 2000), мы проследили распределение мутаций по функциональным доменам молекулы для каждого из 7 клонов рДНК *A. schrenckii*. Структурно-функциональный анализ не выявил каких-либо мутаций в ключевых структурах, связанных с декодированием, транслокацией и трансляционной точностью (спирали 27, 34, 45 петля 530 и участок C1400 с А- и Р-

Филогенетические реконструкции, построенные для As-7 (т.е. последовательности, предположительно кодирующей функциональные молекулы 18S рРНК *A. schrenckii*) при помощи разных методов, показали одинаковую топологию. Амурский осетр *A. schrenckii* и стерлядь *A. ruthenus* определяются в них сестринскими таксонами, от которых последовательно ответвляются *A. sturio*, *A. fulvescens* и *P. spathula* (рис. 14). Причем, достаточно высокую статистическую поддержку получает лишь монофилия рода осетров *Acipenser*.

Полученные результаты согласуются с данными Артюхина (Artyukhin, 1995; 2006), основанными на исследовании морфологии и экологии *Acipenseridae*. Филогенетические связи осетров, реконструированные в цитируемой работе по 21 синапоморфии, указывают на близкие отношения между *A. schrenckii* и *A. ruthenus*, и большую удаленность этих видов от *A. fulvescens* по

сравнению с *A. sturio*. По мнению автора, виды, обитающие в одной эндемичной зоне, являются наиболее близкими, но не обязательно монофилетическими; группы осетровых рыб внутри одной эндемичной зоны могут быть распределены в разные подроды. В частности, амурский осетр (Амурская эндемичная зона) и стерлядь (Адриатическо-Понто-Каспийская зона) входят в один подрод *Sterleta*; балтийский осетр (Северо-Атлантическая

зона) и озерный осетр (Восточно-Американская эндемичная зона) включены в два разных подрода: *Sturio* и *Dinectus*, соответственно.

Иной является топология филогенетических древ, полученных по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК (Ludwig et al., 2001). В ней кластер Acipenseridae разделяется на две монофилетические группы, объединяющие соответственно Атлантические и Тихоокеанские виды, по отношению к которым *A. sturio* занимает базальное положение.

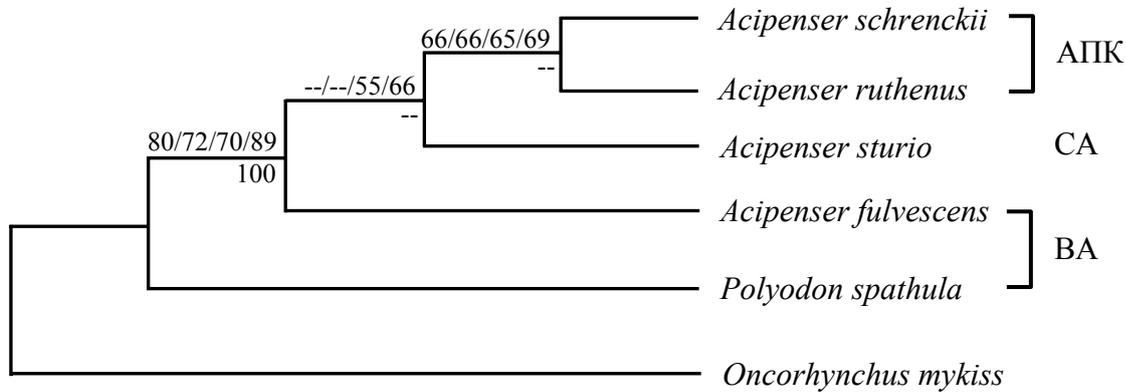


Рис. 14. Филогенетические связи амурского осетра *A. schrenckii* с другими видами Acipenseriformes (данные GenBank) по данным полной последовательности 18S рДНК. Цифры над узлами древа показывают уровень статистической поддержки ветвления для NJ/ME/ML/Bayesian реконструкций, под узлами – для MP; -- означает, что уровень поддержки ниже 50%. АПК – Адриатическо-Понто-Каспийская, СА – Северо-Атлантическая, ВА – Восточно-Американская эндемичные зоны.

Хотя филогенетические реконструкции, основанные на признаках, имеющих разный тип наследования, совпадают далеко не всегда, мы не исключаем, что с вводом в анализ 18S рДНК дополнительных данных по другим видам *Acipenser*, океаническая дифференциация осетровых рыб, выявленная при анализе мтДНК, может быть подтверждена. Пока наши данные можно рассматривать, как доказательство выраженной географической дифференциации Acipenseridae, подчеркивающее глубокую связь видов осетровых рыб с озерными и речными системами.

Таким образом, филогенетический анализ указывает на достоверную генетическую дифференциацию между видами, обитающими в Северной Америке и Евразии, и более тесные связи амурского осетра со стерлядью, чем с атлантическим осетром. Полученные данные позволяют признать полезным использование полноразмерных последовательностей 18S рДНК для биогеографических реконструкций и исследований филогенетических связей между видами осетровых рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование включает RAPD-PCR анализ выборки из 46 особей природных популяций осетровых рыб Амура, а также 70 сеголеток, полученных в результате семи индивидуальных скрещиваний (внутри и между видами, включая разные роды) на базе научно-исследовательской станции ТИНРО-центра, основанный на данных по 173 и 252 локусам, соответственно; клонирование, секвенирование, структурно-функциональный и филогенетический анализы 110 участков 18S рДНК (размером 486 пн) амурского осетра, калуги и гибридов амурского осетра с калугой и сибирским осетром; а также определение полной (1746 пн) последовательности 18S рДНК амурского осетра (7

клонов) и реконструкции ее филогенетических связей с аналогичными участками родственных и филогенетически более далеких видов.

Согласно RAPD данным, аборигенные популяции амурского осетра *Acipenser schrenckii* и калуги *Huso dauricus*, ранее генетическими методами не изучавшиеся, сохранили достаточно высокий уровень генетического разнообразия, намного превышающий таковой в выборках, полученных при искусственном разведении (вероятнее всего, вследствие использования ограниченного числа производителей). Вместе с тем, получены генетические свидетельства гибридного происхождения двух особей (фенотипических гибридов); наличие гибридов в природных популяциях Acipenseridae расценивается как один из факторов риска.

Для каждого из 4 сравниваемых видов осетровых рыб (амурский и сибирский осетры, стерлядь и калуга) выявлены таксон специфичные RAPD маркеры. Диагностические фрагменты для гибридных особей первой генерации не обнаружены, но для них выделены некоторые особенности RAPD спектров: сохранение в одном геноме маркерных фрагментов ДНК обоих родителей (1), наличие специфичных фрагментов ДНК, отсутствующих у родителей (2), и зависимость частоты встречаемости некоторых фрагментов ДНК от направления скрещиваний (3). Если две первые особенности достаточно широко обсуждаются в литературных источниках, третья упоминается лишь в единичных исследованиях искусственных популяций лососевых рыб, что заслуживает особого внимания и дальнейшего исследования.

Статистические методы по данным изменчивости RAPD спектров отчетливо разделяют особей исходных видов и F₁ гибридное потомство с дифференциацией на группы с разным направлением скрещивания. В природной популяции для дискриминации видов и гибридов наиболее эффективными оказались точный тест на дифференциацию популяций и многомерное шкалирование. Таким образом, мультилокусные RAPD-PCR маркеры могут служить удобным и надежным инструментом для проведения генетического мониторинга популяций амурских осетровых рыб с целью сохранения их генофонда, а также использоваться для видовой идентификации коммерческих продуктов.

Феномен множественности аллелей 18S рДНК, свидетельствующий о неполной реализации механизмов согласованной эволюции, был недавно обнаружен у североамериканского вида *A. fulvescens*. Проведенные нами исследования позволили не только выявить в геномах осетровых рыб Амура множественные варианты 18S рДНК, но впервые получить доказательства того, что они (при минимальных межвидовых отличиях характера распределения нуклеотидного разнообразия) подвергаются разным эволюционным ограничениям, предполагающим высокую вероятность наличия среди изученных копий как генных, так и псевдогенных последовательностей. Основной ролью псевдогенизации, по крайней мере, у осетровых рыб, очевидно, является улучшение свойств функциональной последовательности.

Впервые получены генетические свидетельства снижения эффективности механизмов согласованной эволюции 18S рДНК в геномах осетровых рыб при высоких потоках генов, обусловленных гибридизацией, которые выражаются в существенном повышении общего генетического разнообразия последовательностей данного семейства, включая появление гибрид-специфичных мутаций. Мы полагаем, что такой результат, может быть, прежде всего, обусловлен взаимодействиями между локусами с последовательностями рДНК различной функциональной значимости, индуцированными межвидовой/межродовой

гибридизацией. Выявленные особенности молекулярной эволюции рДНК осетровых рыб, их высокое разнообразие на молекулярном уровне, очевидно, дают эволюционное преимущество, помогая видам более успешно адаптироваться к изменениям внешней среды.

Структурно-функциональный и филогенетический анализы полной последовательности 18S рДНК амурского осетра, выполненные впервые, позволили выявить видоспецифичные мутации *A. schrenckii*, а также выделить среди изученных клонов предположительно функциональные последовательности. Филогенетический анализ генов 18S рРНК с привлечением имеющихся к настоящему времени данных из GenBank (по *A. fulvescens*, *A. sturio* и *A. ruthenus*) с высокой вероятностью разделил евразийские виды осетровых рыб с североамериканским озерным осетром и указал на высокую филогенетическую близость амурского осетра со стерлядью.

Таким образом, в настоящей работе получены новые данные о характере генетического разнообразия осетровых рыб и механизмах, генерирующих это разнообразие, имеющие научный и практический интерес. Дальнейшее изучение механизмов согласованной эволюции рДНК и филогенетических связей между видами осетровых рыб по данным полной последовательности гена 18S рРНК представляется нам наиболее перспективными и актуальными направлениями исследований.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружены видоспецифичные RAPD-локусы для амурского осетра *Acipenser schrenckii* (1140), сибирского осетра *A. baerii* (1030-870) и стерляди *A. ruthenus* (420).
2. Выявлено три основных типа отличий в RAPD спектрах геномов гибридов: сохранение маркерных фрагментов ДНК обоих родителей, наличие гибрид-специфичных фрагментов ДНК и зависимость частоты встречаемости некоторых фрагментов ДНК от направления скрещиваний.
3. С помощью молекулярных маркеров ядерной ДНК (RAPD-локусы и локусы 18S рДНК) установлено, что гибриды осетровых рыб F₁ генерации более вариабельны, чем их родители.
4. Получены генетические свидетельства гибридного происхождения двух фенотипических гибридов между амурским осетром и калугой из природной популяции Амура; наличие гибридов расценивается как один из факторов риска.
5. Показано, что аборигенные популяции *Acipenser schrenckii* и *Huso dauricus* Амура сохранили высокий уровень генетического разнообразия; мультилокусные RAPD-маркеры признаются удобным и надежным инструментом для проведения генетического мониторинга популяций амурских осетровых рыб с целью сохранения их генофонда.
6. Обнаружена высокая внутри-индивидуальная изменчивость последовательностей 18S рДНК *A. schrenckii* и *H. dauricus*; уровень изменчивости и характер распределения нуклеотидных замен у осетров Амура такой же, как у североамериканского *A. fulvescens* (GenBank).
7. Доказано, что разные аллельные варианты гена 18S рРНК осетровых рыб Амура испытывают разные селективные ограничения, что позволяет выделить среди них функциональные гены и псевдогены.

8. С привлечением данных из GenBank по полной последовательности гена 18S рРНК, установлены географическая подразделенность осетров на североамериканскую и евразийскую группы и тесные эволюционные связи амурского осетра и стерляди.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рожкован К.В. Феномен индивидуальной изменчивости 18S рДНК у осетров Амура // Вестник ДВО РАН. 2007. Т. 4. С. 136-140.
2. Челомина Г.Н., Рожкован К.В., Киселев К.В., Иванов С.А., Булгаков В.П. Множественность аллелей гена ядерной 18S рРНК осетров Амура: гены или псевдогены // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 420 (2). С. 257-260.
3. Челомина Г.Н., Рожкован К.В., Рачек Е.И., Журавлев Ю.Н. Повышенное генетическое разнообразие 18S рДНК в геномах F₁ гибридов (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii* и *A. schrenckii* × *H. dauricus*) осетровых рыб // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 421 (6). С. 845-849.
4. Челомина Г.Н., Рожкован К.В., Иванов С.А. Дискриминация межвидовых гибридов в природных популяциях осетровых рыб Амура с помощью мультилокусных RAPD-PCR маркеров // Цитология и генетика. 2008. Т. 42 (5). С. 61-71.
5. Рожкован К.В., Челомина Г.Н., Рачек Е.И. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия межвидовых гибридов амурского осетра (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus*, *A. ruthenus* × *A. schrenckii*) по данным изменчивости мультилокусных RAPD-маркеров // Генетика. 2008. Т. 44 (11). С. 1453-1460.
6. Рожкован К.В., Челомина Г.Н., Валова В.Н., Рачек Е.И. Секвенирование последовательности ДНК, кодирующей ген 18S рРНК амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869: гены или псевдогены? // Эволюция жизни на Земле. Материалы III Международного симпозиума. Томск, 2005. С. 66-68.
7. 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 Национальной акад. наук. Беларуси. Минск, 2005. С. 110.
8. Рожкован К.В., Челомина Г.Н., Иванов С.А. Молекулярная эволюция рДНК амурского осетра *Acipenser schrenckii* и калуги *Huso dauricus*: данные частичного секвенирования гена 18S рРНК // Современные проблемы биологической эволюции: материалы международной конференции, посвященной 100-летию Дарвиновского музея. Москва, 2007. С. 162.
9. Rozhkovan K.V., Chelomina G.N., Ivanov S.A. Identification of interspecific hybrids between *Acipenser schrenckii* and *Huso dauricus* in natural populations of Amur River by multilocus nuclear markers // МАРЕЕГ-2007. P. 29.
10. Rozhkovan K.V., Chelomina G.N., Ivanov S.A., Kiselev K.V., Bulgakov V.P. Multiple alleles of the nuclear ribosomal RNA gene in sturgeons of Amur River (*Acipenser schrenckii* and *Huso dauricus*) based on partial sequencing data of cloned 18S rDNA // МАРЕЕГ-2007. P. 30.

РОЖКОВАН
КОНСТАНТИН ВАСИЛЬЕВИЧ

**Молекулярная эволюция 18S рДНК и генетическое разнообразие осетров Амура
Acipenser schrenckii Brandt, 1869 и *Huso dauricus* (Georgii, 1775)**

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук