Ceceof

Столбунова Вероника Владимировна

ОСОБЕННОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ ЛОКУСОВ ЯДЕРНОГО ГЕНОМА И мтДНК ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ПЛОТВЫ (RUTILUS RUTILUS L.) И ЛЕЩА (ABRAMIS BRAMA L.)

03.02.07 - генетика 03.02.06. - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории эволюционной экологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, п. Борок

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор, глав. науч. сотрудник	Яковлев Владимир Николаевич Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институг биологии внугренних вод им. И.Д. Папанина, РАН, п. Борок
кандидат биологических наук, зав. лабораторией	Слынько Юрий Владиславович Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина, РАН, п. Борок
Официальные оппоненты: доктор биологических наук глав. науч. сотрудник	Холодова Марина Владимировна Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва
доктор биологических наук зав. лабораторией	Политов Дмитрий Владиславович Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институг общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва
Ведущая организация:	Федеральное Государственное Научное Учреждение Государственный научно- исследовательский институт озерного и речного хозяйства, г. Санкт-Петербург
диссертационного совета Д 002.214.01	ıra@vigg.ru
бюджетного учреждения науки Института	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Автореферат разослан2012 года	1.
Ученый секретарь диссертационного совета,	

Синельщикова Татьяна Аркадьевна

кандидат биологических наук:

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Стало очевидным, что межвидовая гибридизация повышает изменчивость природных популяций и наравне с наследственной изменчивостью может играть роль «поставщика» эволюционного материала (Даревский, 1974; Мина, 1980). При скрещивании межвидовых гибридов с родительскими формами гибридизация служит механизмом горизонтального переноса адаптивных генов от одного вида к другому и ведет к интрогрессии аллелей или возникновению гибридных полиплоидных видов, обладающих значительным эволюционным потенциалом (Burke, Arnold, 2001). Характер и уровни гибридизации могут значительно меняться ежегодно и зависеть от экологических и климатических условий данной местности (Gillet, Qentin, 2006), что в свою очередь определяет широкое разнообразие сценариев как самой гибридизации, так и ее эволюционных последствий. Показано, что при однократном или непродолжительном вселении чужеродных популяций симпатрического вида в депрессивную популяцию аборигенного вида, изолирующие механизмы оказываются неэффективными, что приводит к установлению интрогрессивной межвидовой гибридизации и к конкурентоспособному исключению популяций местных видов (Титов и др., 2007).

Большинство исследований направлены на обнаружение эколого-генетических последствий отдаленной гибридизации, эффектов интрогрессии генов и поиск универсальных маркеров для идентификации гибридов (Wyatt et al., 2006; Hayden, 2010). Ключевой проблемой в понимании эволюционной и экологической значимости межвидовой гибридизации является проблема эффективной коадаптации геномов скрещивающихся видов, которая касается не только чужеродных ядерных геномов, но и их ядерно-цитоплазматических взаимодействий. в результате гибридизации происходит интрогрессия митохондриальной ДНК (мтДНК) в геном другого вида, что стало одной из основных причин парафилии (Funk, Omland, 2003). Сочетание в гибридном геноме мтДНК одного вида и ядерной ДНК может сообщать ЭВОЛЮЦИИ последнего дополнительную другого направленность, что позволяет рассматривать гибридов в качестве живой модели для изучения проблемы согласования работы разных геномов в онтогенезе, особенно в таком его критическом периоде, как раннее развитие (Корочкин, 1983). Учитывая, что семейство карповых (Cyprinidae) наиболее объемно по числу видов (2100) и по числу случаев естественной гибридизации (162) (Schwartz, 1981), изучение данной проблемы проводилось на гибридах плотвы (Rutilus rutilus) и леща (Abramis brama). Гибридизация между этими видами относится к категории "b" «от случая к случаю» по классификации Э. Майра (Mayr, 1965), когда гибриды F1 фертильны и способны к скрещиванию с родительскими видами. Численность гибридов плотвы и леща в отдельных популяциях может достигать 36-71%% (Fahy et al., 1988). Межвидовая гибридизация «от случая к случаю» рассматривается как особый тип размножения, сочетающий основные признаки полового процесса (синкария, редукционное деление) и апомиксиса (бесполое размножение, полногеномное наследование) (Яковлев и др., 2000). При этом апомиксис облегчает освоение новых территорий, обеспечивает двукратное преимущество в темпах воспроизводства по сравнению с бисексуальными популяциями, позволяет тиражировать в ряду поколений одни и те же высокоприспособленные генотипы без снижения гетерозиготности (Vrijenhoek et al., 1977). По данным Н.И. Николюкина (1952) во втором и последующих поколениях гибриды "растворяются" в родительских стадах, что способствует сохранению границ видов. Предполагается, что успешность гибридизации обеспечивается путем формирования

генетической программы системного ответа организма на структурные преобразования генома (Левонтин, 1978; Чадов, 1981). Наиболее эффективно коадаптация обеспечивается премейотической сегрегацией родительских геномов, что позволяет преодолеть даже значительные различия в последовательностях ДНК (Беннет, 1986). В результате работ А. Вилсона с данными «протеиновой таксономии» и Б. Медникова по таксонопринтам был сделан вывод, что важнейший молекулярный барьер, препятствующий межвидовой гибридизации, заключается в различии регуляторных систем родительских геномов (обзор: Шварц, 1980). Поэтому исследование этих различий особенно интересно, когда такое скрещивание произошло. Вместе с тем, работ, затрагивающих вопросы взаимодействия отдельных фрагментов ДНК при гибридизации у рыб сравнительно немного (Avise et al., 1987; Pitts et al., 1997; Хрисанфова и др., 2004; Луданный и др., 2007; Hayden et al., 2010, 2011).

Цель настоя шей работы состояла в изучении особенностей наследования локусов ядерного и митохондриального геномов на разных стадиях онтогенеза у гибридов F1, F2, Fb плотвы (*R. rutilus*) и леща (*A. brama*).

Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- **1.** На основании изучения полиморфных и мономорфных ядерных маркеров (RAPD, ITS1 рибосомальной ДНК (рДНК), неспецифические эстеразы) оценить внутри— и межвидовую изменчивость чистых видов плотвы (*R. rutilus*), леща (*A. brama*) и их межвидовых гибридов F1, Fb (бэккроссы).
- **2.** Выявить особенности наследования RAPD фрагментов у реципрокных гибридов F1 и бэккроссов.
- **3.** Подтвердить гибридный статус и принадлежность потомков конкретной родительской паре с помощью микросателлитных локусов.
- **4.** Провести экспериментальные скрещивания между плотвой (*R. rutilus*), лещом (*A. brama*) и гибридами плотва х лещ и анализ наследования видоспецифических маркеров (цитохром b (cyt b), ITS1 рДНК) у гибридов F1, F2, Fb на разных стадиях онтогенеза.
- **5.** С использованием комплекса молекулярно-генетических маркеров и морфологических признаков оценить вклад родительских видов в генетическую изменчивость гибридов и установить возможные эффекты в достижении коадаптации геномов скрещивающихся видов, а также эволюционные и экологические последствия при гибридизации.

Научная новизна работы. Исследований по анализу генетических последствий межвидовой гибридизации на уровне рДНК и мтДНК у диплоидных карповых рыб в экспериментальных условиях не проводилось. Выполнены межвидовые, межгибридные и возвратные скрещивания; у гибридов (F1, Fb, F2) проведен анализ наследования маркеров ядерного генома (ITS1 рДНК, RAPD, микросателлиты) и мтДНК (суt b). Обнаружено, что в первом поколении гибридов при коадаптации двух чужеродных геномов на ранних стадиях развития происходит элиминация одного из родительских наборов рибосомных генов. Показано, что перестройки в рДНК характерны как для соматической ткани, так и для клеток генеративного пути и способны оказывать влияние на формирование гибридного морфотипа. В потомстве от межгибридных и возвратных скрещиваний на гибридную самку, где самка и самец имеют мтДНК разных видов обнаружено существенное отклонение от монолокусного наследования ITS1 фрагмента. В таком типе скрещиваний формируется немногочисленный класс потомков с мтДНК одного вида и ядерными генами другого, через геном которых происходит интрогрессия мтДНК, что было показано экспериментально. По морфотипу данный класс потомков не отличается от остальных сибсов. Подобранные маркеры (RAPD, ITS1 рДНК, суt

b, микросателлиты) при комплексном использовании позволяют дифференцировать чистые виды и их межвидовых гибридов F1, Fb, а также идентифицировать гибридов с учетом направления скрещивания.

Теоретическое и практическое значение работы. Исследование взаимодействия в гибридном геноме рДНК плотвы и леща, различных по количеству копий, открывает возможность изучения связи геномной организации с одной из важнейших функций клетки - биосинтезом рибосом. Данные будут иметь большое значение для изучения роли ядрышкового организатора в стабильности генома. Полученный материал дает возможность моделировать процессы гибридизации в природе, создавать исходные формы для генетических исследований и селекции, а также является хорошей моделью для изучения механизмов формирования смещанных и гибридных поселений симпатрических видов, как рыб, так и млекопитающих. Результаты работы могут быть использованы при оценке состояния популяций промысловых видов рыб и разработке генетических методов прогноза вылова; в селекционной практике рыбоводства; в природоохранной деятельности и разработке мер по контролю сохранения биоразнообразия.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Межднар. науч. конф. 'Тенетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб'' (Санкт- Петербург, 2008 г.), II Всероссийской научно- практической конференции (Нижний Тагил, 2008 г.), XIII Международной школе - конференции «Биология внугренних вод» (Борок: ИБВВ РАН, 2007 г.), Международ. науч. конф. "Ихтиологические исследования на внутренних водоемах" (Саранск, 2007 г.), IV Междунар. науч. конф. «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах (Днепропетровск, 2007 г.), рабочем совещании «Штрих-кодирование видов рыб в России на основе ДНК. Интеграция в глобальную программу Fish-BOL» (ИБМ РАН, Владивосток, 2007 г.), 12-ом международном Ихтиологическом конгрессе (Dubrovnik, Croatia, 2007 г.), II Международной ихтиологической научно-практической конференции" Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии" (Севастополь, 2009 г.), III Междунар. конференции «Чужеродные виды в Голаркти ке» (Борок, 2010 г.), Междунар. конференции "Частные проблемы теоретической и практической ихтиологии" (Одесса, 2011 г.).

Объем и структу ра работы. Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы (293 источника), раздела благодарностей и приложений (12 страниц). Работа включает 18 таблиц и 33 рисунка.

Декларация личного участия автора. Диссертация написана автором лично с использованием собственных результатов. Автор принимал участие в полевых работах по сбору биологического материала и в получении экспериментального материала, совместно с коллегами из лаб. эволюционной экологии (Слынько Ю.В., Карабановым Д.П., Овчин никовой Н.В., Лавровой Е.И., Пакуновой Е.Н.) и лаб. биохимии водных животных (Кузьминым Е.В., Хлыстовым Д.Н.). Автор лично проводил RAPD-ПЦР, локус-специфическую ПЦР, анализ микросателлитных локусов и изоферментов. Автор самостоятельно проводил статистическую обработку данных и оформлял результаты своих исследований. Обработка морфологических данных была осуществлена в рамках общего проекта совместно с сотрудником лаб. эволюционной экологии к.б.н. Ю. В. Кодуховой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Произведена постановка трех типов скрещивания: реципрокные межвидовые, возвратные скрещивания на гибридного самца и гибридную самку, межгибридные скрещивания (табл. 1). В качестве производителей использовались самки и самцы реципрокных гибридов F1, полученные искусственно и выращенные до половозрелого состояния, а также самцы и самки плотвы и леща из Рыбинского водохранилища. Для каждой повторности использовали разных производителей; всего проанализировано 34 производителя, 160 гибридов F1, 490 Fb и 74 F2. По каждому типу скрещивания отбор проб производили на стадии сеголетка и по стадиям раннего развития (икра, эмбрионы, личинки). Анализ наследования проведен по локусам ядерной ДНК (ITS1 регион рДНК, RAPD-маркеры, микросателлиты) и мтДНК (суt b) методом локус-специфической ППР. Получение видоспецифических фрагментов ядерного генома (ITS1 региона рДНК) и мтДНК (cyt b), которые у плотвы и леща имеют разную длину, проводили с двух прямых видоспецифических праймеров использованием и одного универсального для обоих видов (Wyatt et al., 2006) (рис. 1). Достоверность различий между наблюдаемым и ожидаемым распределением потомков в выборках проверяли с помощью теста на χ^2 (STATISTICA, ver. 6.0).

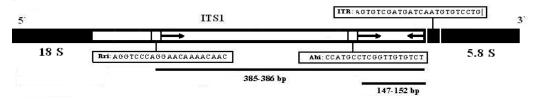


Рис.1. Схема посадки праймеров для амплификации видоспецифического ITS1 фрагмента: обратного ITR и двух прямых праймеров Abi, Rri. Показан размер ампликонов ITS1 рДНК плотвы (385-386 п.н.) и леща (147-152 п.н.)

Для выявления геномной вариабельности и оценки уровня полиморфизма плотвы (П), леща (Π) , реципрокных гибридов F1 $(\Pi\Pi \ u \ \Pi\Pi)$ и бэккроссов $(\Pi^*\Pi\Pi, \Pi^*\Pi\Pi, \Pi\Pi^*\Pi)$ $(40 \ экз.)$, а также их дифференциации использовали RAPD-анализ со случайными праймерами следующего состава: OPA11 5`-CAATCGCCGT-3`, OPA17 5`-GACCGCTTGT-3`; OPA19 5`-CAAACGTCG G-3'; R45 5'-GCCGTCCGAG-3'; P29 5'-CCGGCCTTAC-3'; OPA20 5'-GGTCTAGAGG-3'; SB2 5`-GACGGCCAGTATT-3` (Хрисанфова и др., 2004). Для контроля гибридной природы, принадлежности потомства конкретной родительской паре и исключения случаев гиногенеза были использованы следующие микросателлитные локусы: Сур 63, Сур 648, Сур 640, CypG24, CypG23 (Baerwald, May, 2004); Ca3, Ca5, Ca12 (Dimsoski et al., 2000). Для каждой родительской пары подбирались по три локуса так, чтобы аллели самки и самца не совпадали. Выделение тотальной ДНК проводили по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции из крови, содержащей 50мМ ЭДТА pH-0.8, или фиксированных в 70° спирте мышечной ткани, икры, эмбрионов и личинок (Mathew, 1984). Проведен анализ родительских особей и сеголеток бэккроссов (табл. 1, скрещивания 15-18) с использованием комплекса разнородных морфологических признаков: Db число разветвленных лучей в спинном плавнике, Ab число разветвленных лучей в анальном плавнике; d.ph. число глоточных зубов; l.l. число чешуй в боковой линии; число позвонков в грудном (Va), переходном (Vi) и хвостовом (Vc) отделах, общее число позвонков (Vert); длина головы (c); длина основания анального плавника (lA); длина основания спинного плавника (lD); антеанальное расстояние (aA); постанальное расстояние (pA); антедорсальное расстояние (aD) (Правдин, 1966; Pitts et al., 1997). Тип осевого скелета определяли по отношению числа позвонков в грудном и хвостовом отделах: "тип плотвы"- $Va \ge Vc$, тип «леща» Va < Vc. Для каждой особи определяли средние значения (M), пределы вариации (lim), ошибку средней (m). При сравнении использовали линейные комбинации признаков, анализ которых проводили методом главных компонент (Ивантер, Коросов, 2003) и древовидной кластеризации в пространстве евклидовых расстояний (Statistica 6.0). Для анализа полиморфизма неспецифических эстераз леща, плотвы, синца ($Abramis\ balerus$) использовали ткани печени, сердечной, скелетной мышц, сыворотку крови. Проанализировано пять выборок леща Рыбинского, Угличского и Горьковского в-ща (281 экз.), две выборки синца (91 экз.) и 30 экз. плотвы Рыбинского в-ща. Тест на гетерогенность выборок и χ^2 - критерий рассчитывали по (Животовский, 1991).

Таблица 1. Характеристика экспериментальных скрещиваний

Nº	год	Стадия	Кол-во	, p. 11 11 12 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17					
скрещ.		отбора проб	потомков	самка	самец				
1	2007	лич инки*	29	⊊ Лещ	∂Плотва				
2	2007	ЛИЧ ИНКИ	12	♀ Лещ1	∂Плотва1				
3	2008	сеголетки	12	♀ Лещ2	∂Плотва2				
4	2010	сеголетки	39	♀ Лещ3	∂Плотва3				
5	2008	ЛИЧ ИНКИ*	34	⊊Плотва	∂Лещ				
6	2008	сеголетки	22	⊊Плотва1	∂Лещ1				
7	2008	сеголетки	11	⊊Плотва2	∂Лещ2				
				Производители для получения бэккроссов и					
					гибридов F2				
8	2007	лич + сег	54	⊊Плотва	∂Лещ-Плотва				
9	2010	ЛИЧ ИНКИ	22	⊊Плотва1	∂Плотва-Лещ				
10	2010	ЛИЧ ИНКИ	21	⊊Лещ	∂Плотва-Лещ1				
11	2010	ЛИЧ ИНКИ	21	⊊Лещ1	∂Лещ-Плотва1				
12	2007	сеголетки	30	⊊Лещ-Плотва2	∂Лещ2				
13	2007	лич + сег	45	⊊Лещ-Плотва3	∂Плотва-Лещ2				
14	2007	лич + сег	29	⊊Лещ-Плотва4	∂Плотва-Лещ3				
15	2010	лич + сег •*	77	ОЛош Плотроб	∂Плотва2				
16	2010	лич + сег •	66	⊊Лещ-Плотва5	∂Лещ3				
17	2010	лич + сег •	77	ОПпотро Пош 4	∂Лещ4				
18	2010	сеголетки•*	48	⊊Плотва-Лещ4	∂Плотва3				

^{*-} скрещивания с анализом потомков по стадиям развития.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Генетическая дифференциация и геномная вариабельность плотвы (R. rutilus), леша (A. brama) и их гибридов

1.1. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПЛОТВЫ И ЛЕЩА РЫБИНСКОГО В-ЩА ПО RAPD-МАРКЕРАМ

Внутри- и межвидовую изменчивость по мультилокусным RAPD-маркерам изучали на двух выборках плотвы (*R. rutilus*) и леща (*A. brama*) Рыбинского водохранилища. При суммировании данных по двум праймерам всего для двух видов выявлено 89 локусов, из них 10 оказались мономорфными межвидовыми. Видоспецифических мономорфных фрагментов у плотвы и леща обнаружено 18 и 33, соответственно. Число фрагментов в индивидуальных спектрах варьировало от 42 до 53. Выборки достоверно различались между собой по среднему значению числа фрагментов и коэффициенту сходства (tg = - 4.8; p< 0.0001). Уровень полиморфизма плотвы составил 74%, леща - 53%. В результате обработки матрицы в программе Treecon получено четкое разделение видов на два кластера с индексом бутстрепа 100% (рис. 2). Значения внугригруппового сходства в выборке плотвы варьируют в пределах 0.16-0.33, леща 0.15-0.21. Таким образом, RAPD-анализ показал, что по данным маркерам плотва более вариабельна, чем лещ; на чистых видах выявлены специфические особенности RAPD-маркеров и подобран набор праймеров для анализа гибридов F1 и бэккроссов.

^{•-} скрещивания с морфологическим анализом потомков.

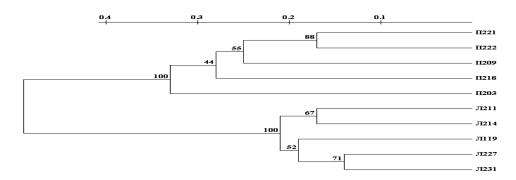


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства плотвы и леща по RAPD-маркерам; Пххх - особи плотвы; Лххх - особи леща; вверху — шкала генетического сходства (Ней, 1975); в узлах ветвления даны значения индекса бутстрепа (%)

1.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПЛОТВЫ, ЛЕЩА, ГИБРИДОВ F1, Fb В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ

RAPD-анализ генетической изменчивости плотвы, леща и гибридов F1 был проведен ранее (Хрисанфова и др., 2004). В нашем исследовании подобранный набор праймеров использован для оценки уровня изменчивости и дифференциации родительских видов (плотвы и леща), реципрокных гибридов F1(ЛП и ПЛ) и трех классов бэккроссов (П*ПЛ, П*ЛП, ПЛ*П) (табл. 2). Кроме того, проведен анализ наследования родительских локусов в индивидуальных скрещиваниях.

Таблица 2. Генетический полиморфизм в выборках плотвы, леща, гибридов F1 и бэккроссов

выборка	Кол-во	Кол-во RAPD-фрагментов по шести праймерам.								P,%	
выоорка	штук	1	2	3	4	5	6	7	N(±σ)	Γ,/0	
ПП	5	68	72	72	73	74	-	-	71.8 ± 2.3	78.0	
ЛЛ	5	71	59	63	63	68	-	-	64.8 ± 4.7	64.0	
ПЛ	6	66	74	65	79	66	70	-	70.0 ± 5.5	74.0	
ЛП	6	51	54	62	71	57	71	-	61.5 ± 7.8	76.0	
П*ПЛ	6	79	75	72	70	74	63	-	72.2 ± 5.4	85.0	
П*ЛП	5	75	75	71	72	75	-		73.6 ± 1.9	75.0	
ПЛ*П	7	67	79	75	62	69	74	75	71.6 ± 5.8	74.0	

Условные обозначения: $N(\pm \sigma)$ — среднее число RAPD-фрагментов в индивидуальных спектрах; P — доля полиморфных локусов.

Найдены достоверные различия между плотвой и лещом, плотвой и гибридами (ЛП) и при сравнении выборок леща с выборками возвратных гибридов (П*ПЛ и П*ЛП, р<0.05). Число локусов в геноме плотвы и леща (111 и 106, соответственно) оказалось несколько ниже, чем в гибридных спектрах (ПЛ; ЛП; П*ПЛ; П*ЛП; ПЛ*П- 117, 110, 138, 118, 114); из 8 мономорфных межвидовых локусов отмечен 6 общих для всех выборок гибридов. Выявлено наследование мономорфных межвидовых локусов всеми группами гибридов, в то время, как мономорфные видоспецифические локусы леща и плотвы наследовались в зависимости от направления скрещивания (табл. 3). Показано наличие у гибридов RAPD-фрагментов, отсутствующих у родительских видов ("неродительские"), которые составили 2.4%. Метод UPGMA-кластеризации и классификационный анализ выборок в пространстве I и II компонент позволили надежно дифференцировать чистые виды, гибридное потомство F1 и Fb без дифференциации по направлениям скрещивания (рис. 3). Бэккроссы продемонстрировали достоверное тяготение к гибридам F1.

Анализ наследования в индивидуальных скрещиваниях показал, что спектр гибридов F1 содержит большее число RAPD-фрагментов по сравнению с родительскими особями чистых видов (самка леща – 16 фрагментов, самец плотвы – 12, гибриды 19 – 21, рис. 4, Б).

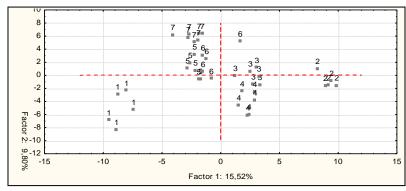


Рис. 3. Распределение особей плотвы (1), леща (2), гибридов первого поколения ПЛ (3) и ЛП (4), бэккроссов: $\Pi^*\Pi \Pi$ (5), $\Pi^*\Pi \Pi$ (6), $\Pi \Pi^*\Pi$ (7) в пространстве главных компонент

Таблица 3. Количество внутри- и межвидовых мономорфных RAPD-локусов в выборках плотвы, леща, реципрокных гибридов F1 и Fb

	ПЛОТВА	ЛЕЩ	ПЛ	лп	П*ПЛ	П*ЛП	Пл*П
ПЛОТВА	26(0.16)	8 (0.04)	11(0.06)	6(0.03)	14(0.08)	11(0.06)	15(0.09)
ЛЕЩ	8 (0.04)	38(0.23)	13(0.07)	7(0.04)	6(0.03)	11(0.06)	10(0.05)
плотва+лещ	-	-	12(0.06)	14(0.08)	15(0.09)	20(0.12)	19(0.11)

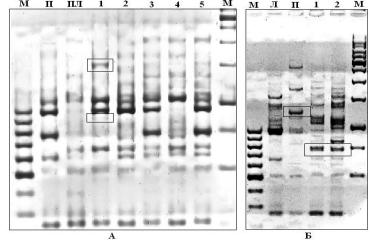


Рис. 4. Индивидуальные RAPD-спектры самки плотвы, гибридного самца ПЛ и их гибридов П*ПЛ 1-5 (A) и самки леща, самца плотвы и их гибридов ЛП 1, 2 (Б) по праймеру SB2. Выделены "неродительские" фрагменты. М — маркер молекулярных масс (справа - 1kb, слева - 100bp)

В индивидуальных спектрах бэккроссов также отмечено увеличение числа фрагментов по сравнению с родителем чистого вида; все они близки по общему набору RAPD-фрагментов к гибридному родителю (рис. 4A). Было отмечено, что спектры гибридов F1 и Fb представляют собой либо различные сочетания RAPD-фрагментов родительских особей, либо независимо наследуемые варианты амплифицированных фрагментов ДНК одного из родительских видов, что, вероятно, связано с гетерозиготностью данного уникального полиморфного локуса. В гибридном спектре выявлены и "неродительские" фрагменты (рис. 4).

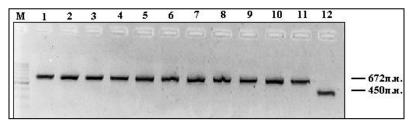
2. Анализ наследования локусов ядерного генома и мтДНК у гибридов плотвы и леща

2.1. ОСОБЕННОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ В ПЕРВОМ ПОКОЛЕНИИ ГИБРИДОВ

2.1.1. Наследование мтДНК в экспериментальных скрещиваниях леща и плотвы.

МтДНК наследуется по материнской линии, что позволяет идентифицировать гибридов по направлению скрещивания. *Анализ мтДНК производителей* выполнен на четырнадцати родительских особях семи индивидуальных скрещиваний. Видовой статус всех использованных в скрещиваниях производителей леща и плотвы полностью подтвердился. *Анализ мтДНК потомков от реципрокных скрещиваний* показал, что у гибридов F1 во всех скрещиваниях маркер суt в мтДНК наследовался по материнской линии и был представлен

фрагментом леща (672 п.н.) – в скрещиваниях $\mathcal{P}\Pi x \mathcal{T}\Pi$ и плотвы (450 п.н.) – в скрещиваниях $\mathcal{P}\Pi x \mathcal{T}\Pi$ (рис. 5).



2.1.2. Особенности наследования ITS1 фрагмента у гибридов F1 на ранних стадиях развития

рДНК — многокопийный ген, расположенный в области ядрышкового организатора (NORs), который у плотвы и леща находится на концах одной хромосомной пары (Bianco et al., 2004). Известно, что последовательности ITS1 рДНК плотвы и леща демонстрируют генетическую неоднородность индивидуальных копий и имеют высокий уровень межвидовых отличий. Видоспецифические праймеры подобраны с учетом известных гаплотипов А и В и показано, что видоспецифические фрагменты плотвы и леща имеют разную длину и хорошо различаются в агарозном геле (Wyatt et al., 2006). У гибрида F1 наследуются оба видоспецифических родительских ITS1 фрагмента.

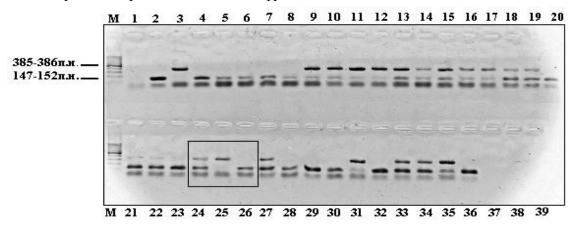


Рис. 6. Локус-специфическая ПЦР ITS1 региона на разных стадиях индивидуального развития. Скрещивание \mathfrak{P} Лх \mathfrak{I} П, 2 - самка леща, 3 - самец плотвы; 4-8 - неоплодотворенная икра; межвидовые гибриды F1: 9-13, 40 мин. после оплодотворения; 14-18 - морула; 19-22 - гаструла; 23-26 - эмбрион перед вылуплением; 27-31 - эмбрион с желточным мешком; 32-36 - эмбрион без желточного мешка; М - маркер молекулярных масс (100 п.н.). Слева указана длина видоспецифических ITS1 фрагментов леща (147-152 п.н.) и плотвы (385-386 п.н.)

 родительских ITS1 фрагмента. Однако, как и в реципрокном скрещивании, на стадии гаструлы была обнаружена одна особь, материнский ITS1 фрагмент которой был утрачен. Таким образом, при сравнении результатов реципрокных скрещиваний показано, что в скрещивании, где самкой был лещ, количество особей с одним родительским ITS1 фрагментом составило 28% (29 экз.); в скрещивании, где самкой была плотва - 1.5% (34 экз.).

2.1.3. Наследование ITS1 фрагмента у гибридов F1 на стадии сеголетка

Для исключения специфических особенностей стадий раннего развития был проведен анализ наследования ITS1 маркера в реципрокных скрещиваниях на стадии сеголетка. В скрещивании самки леща с самцом плотвы ($$\mathbb{Q}\Pi3x\mathbb{Q}\Pi3$) был обнаружен только один гибрид с отсутствием плотвиного ITS1 фрагмента (рис. 7, № 28), в скрещивании $$\mathbb{Q}\Pi2x\mathbb{Q}\Pi2$ — два гибрида с одним материнским ITS1 фрагментом. При анализе реципрокных гибридов F1 (ПЛ) от скрещивания самки плотвы с самцом леща в скрещиваниях $$\mathbb{Q}\Pix\mathbb{Q}\Pi$ и $$\mathbb{Q}\Pi1x\mathbb{Q}\Pi1$ у всех потомков был обнаружен ожидаемый гибридный вариант ITS1 региона, содержащий как материнский, так и отцовский ITS1 фрагменты.

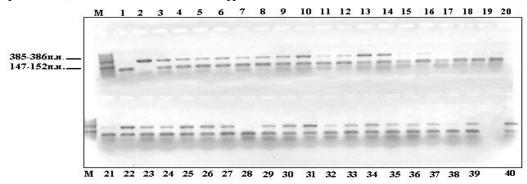


Рис. 7. Локус-специфическая ПЦР ITS1 региона сеголеток гибридов F1. Скрещивание ♀Л3х♂П3, 1 - самка леща, 2 - самец плотвы; 3- гибриды ЛП. М - маркер молекулярных масс (100 п.н.). Слева указана длина видоспецифических ITS1 фрагментов леща (147-152 п.н.) и плотвы (385-386 п.н.)

Таким образом, отсутствие единообразия в гибридном потомстве F1 по ITS1 маркеру, сопровождаемое появлением гомозиготных вариантов, вызвано элиминацией одного из родительских кластеров рибосомных генов. Выявлено три типа потомков по наследованию ITS1 региона: гибридный - присутствие обоих родительских ITS1 фрагментов плотвы и леща, лещовый — присутствие лещового ITS1 фрагмента, плотвиный - присутствие плотвиного ITS1 фрагмента (рис. 8). Все три типа гибридов F1 отмечены на стадии «эмбрион перед вылуплением» в потомстве одного скрещивания (рис. 6).

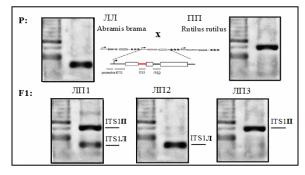


Рис. 8. Видоспецифические ITS1 фрагменты леща, *A. brama* (ЛЛ) и плотвы, *R. rutilus* (ПП) у чистых видов и у гибридов первого поколения. ЛП1- гибридный ITS1, ЛП2- лещовый ITS1, ЛП3- плотвиный ITS1. Левый паттерн- маркер молекулярных масс 100 п.н., правый - индивидуальный спектр. Длина ITS1 фрагмента леща (ITS1) - 147-152 п.н., плотвы (ITS1) - 385-386 п.н.

2.2. ОСОБЕННОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ У ГИБРИДОВ ВОЗВРАТНЫХ И МЕЖГИБРИДНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ

2.2.1. Наследование мтДНК

Межвидовые гибриды плотвы и леща плодовиты и способны к скрещиванию с родительскими видами (Николюкин, 1987; Pitts, 1995). Обозначены два направления

возвратных скрещиваний: когда гибриды F1 являются самцами (ПхПЛ(ЛП) и ЛхЛП(ПЛ) и - самками (ПЛ(ЛП)хП и ЛП(ПЛ)хЛ). Среди возвратных и межгибридных скрещиваний различают скрещивания, в которых самка и самец имеют мтДНК одного вида, и скрещивания, когда они имеют различную мтДНК (ПхЛП, ЛхПЛ, ЛПхП, ПЛхЛ, ЛПхПЛ, ПЛхЛП). Для контроля мтДНК производителей проведен анализ девятнадцати родительских особей, восьми самок и одиннадцати самцов, из них десять гибридной природы. Видовой статус чистых видов по сут b-маркеру полностью подтвердился; все гибридные самки и самцы имели сут b в соответствии с направлением скрещивания. При анализе мтДНК у гибридов нарушений наследования сут b-маркера не обнаружено. МтДНК бэккроссов была представлена материнским фрагментом сут b леща в скрещиваниях ЛПхП(ЛП) и ЛхПЛ(ЛП), плотвы в скрещиваниях ПЛхЛ(П) и ПхПЛ(ЛП).

Таблица 4. Отношение классов потомков по ITS1 региону у гибридов Fb и F2.

	Стадия отбора	Кол-во,	P,	ITS			S1 твы	ITS	
Скрещивание	проб	ШТ.	Γ,	шт.	дный %	ШТ.	_{1ВЫ}	леі шт.	ца %
	•	(DOLUMBAH)	і ия на гибри,			ш1.	/0	ш1.	/0
		•		_		10	40		0
⊊П x ∂ЛП	ЛИЧ ИНКИ	30	P<0.05	18	60	12	40	0	_
Ţ O	сеголетки	24	P<0.05	14	58	10	42	0	0
♀П1 x ∂ПЛ	ЛИЧ ИНКИ	22	P<0.05	10	45	12	55	0	0
⊊Л x ∂ПЛ1	ЛИЧ ИНКИ	21	P<0.05	13	62	0	0	8	38
⊊Л1 x ∂ЛП1	ЛИЧ ИНКИ	21	P<0.05	7	33	0	0	14	67
		Межгибр	идные скре	щиван	ия				
оппа у ⊅ппа	ЛИЧ ИНКИ	17	P<0.05	3	18	7	41	7	41
⊊ЛП3 х ∂ПЛ2	сеголетки	28	P<0.05	10	36	5	18	13	46
⊊ЛП4 x ♂ПЛ3	лич инки	29	P<0.05	4	14	13	45	12	41
	С	крещиван	ия на гибри	дную с	амку				
⊊ЛП2 x ∂Л2	сеголетки	30	P<0.05	16	53	0	0	14	47
0 ППБ v	ЛИЧ ИНКИ	34	-	0	0	34	100	0	0
⊊ЛП5 x ♂П2	сеголетки	43	-	0	0	43	100	0	0
OППБ v	ЛИЧ ИНКИ	23	P>0.05	10	44	0	0	13	56
⊋ЛП5 x ♂Л3	сеголетки	43	P>0.05	23	53	0	0	20	47
⊊ПЛ4 x ♂Л4	ЛИЧ ИНКИ	29	P>0.05	11	38	0	0	18	62
¥1 114 X ○114	сеголетки	48	P>0.05	32	67	0	0	16	33
⊊ПЛ4 x ♂П3	сеголетки	48	P>0.05	21	46	25	54	0	0

2.2.2. Наследование ядерного ITS1-фрагмента у гибридов Fb и F2

Наследование при межсибридном скрещивании. Анализ гибридов F2 проведен на потомках двух разных скрещиваний гибридной самки ЛП с гибридным самцом ПЛ (\mathcal{P} ЛПх \mathcal{E} ПЛ, табл. 4). Родители были гетерозиготны по ITS1-фрагменту, однако самка ЛП имела мтДНК леща, а самец ПЛ - мтДНК плотвы. В данном типе скрещивания ожидается получение в потомстве по 25% гомозигот обоих типов (ПП и ЛЛ) и 50% гетерозигот (ЛП, ПЛ). Скрещивание \mathcal{P} ЛПЗх \mathcal{E} ЛЛ2 (рис. 9). При анализе потомства на стадии личинки выявлено отклонение в расшеплении получаемых классов потомков: количество гомозигот ЛЛ и ПП составило по 41%, тогда как гибридный ITS1 (ЛП, ПЛ) имели 18% особей. Расшепление по генотипу в F2 на стадии личинки выражается отношением 2:1:2. Анализ данных по сеголеткам демонстрирует самый высокий процент особей с одним фрагментом леща (ЛЛ - 46%), количество гетерозигот увеличено до 36% (ЛП, ПЛ), а гомозиготы ПП составили 18%. Расшепление по генотипу на стадии сеголетка выражается отношением 3:2:1. Таким образом, кроме отклонения от ожидаемого расшепления в потомстве, показано сокращение числа гомозигот ПП на стадии сеголетка в 2 раза, что может указывать на разную жизнеспособность

классов зигот. При объединении данных по наследованию ITS1 и суt в маркеров было выявлено, что класс гомозигот ПП имеет рибосомные гены плотвы и мтДНК леща (рис. 10). Сочетание в гибридном геноме мтДНК одного вида и рДНК другого могло повлиять на снижение их жизнеспособности. Необходимо отметить, что данный класс потомков формируется во всех межгибридных скрещиваниях и в возвратных скрещиваниях на гибридную самку, когда самка и самец имеют мтДНК разных видов.

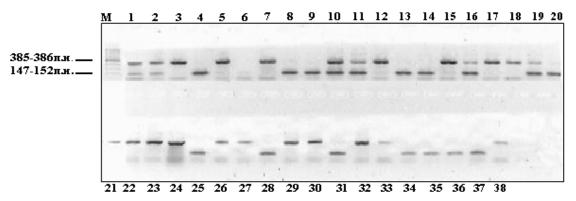


Рис. 9. Наследование ITS1 фрагмента в межгибридном скрещивании♀ЛП4х♂ПЛ3. 1-♀ЛП; 2- ♂ПЛ; 3-7неоплодотворенная икра; 8- 38- гибриды F2. М - маркер молекулярных масс 100 bp. Слева указана длина видоспецифических ITS1 фрагментов леща (147-152 п.н.) и плотвы (385-386 п.н.)

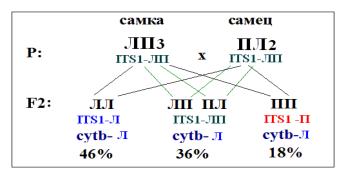


Рис. 10. Отношение классов потомков по ITS1 фрагменту на стадии сеголетка в межгибридном скрещивании $$\Gamma$$ ЛП3х $$\Gamma$$ ЛЛ2

Л и П- обозначения гаплоидных геномов леща и плотвы. ITS 1-ЛП- гибридный ITS 1

В межгибридном с*крещивании* $\bigcirc \Pi\Pi 4x \bigcirc \Pi\Pi 3$ анализ гибридов F2 проведен на <u>стадии личинки</u> (табл. 4). Отмечено наличие трех классов потомков по ITS1, при этом гомозиготы ЛЛ составили 41%, $\Pi\Pi$ - 45%, гетерозиготы ЛП и Π Л - 14%. Показано отклонение от ожидаемого рас щепления классов потомков, как и в предыдущем межгибридном скрещивании.

Наследование в скрещиваниях самки чистого вида с гибридным самцом. В анализирующем скрещивании на гомозиготного родителя теоретически потомство должно быть представлено гетеро- и гомозиготами в отношении 1:1. При анализе бэккроссов на стадии личинки от возвратного скрещивания чистой плотвы с гибридным самцом ЛП (\P Пх \r ЛП), где самка имела мтДНК плотвы, а самец - мтДНК леща, отмечено наличие двух классов потомков по ITS1: гомозигот ПП (ITS1 плотвы) - 40%, гетерозигот ПЛ (гибридный ITS1) - 60%. На стадии сеголетка количество гомо- и гетерозигот составило 42% и 58%, соответственно (табл. 4). При скрещивании самки чистого леща с гибридным самцом ПЛ (\P Лх \r ПЛ), где самка имела мтДНК леща, а самец - мтДНК плотвы, на стадии личинки также отмечено незначительное преобладание бэккроссов с гибридным ITS1 фрагментом (ЛП - 62%) (табл. 4). При анализе наследования ITS1 маркера в скрещиваниях на гибридного самца было выявлено, что когда самка и самец имели мтДНК одного вида, отношение гетеро- и гомозигот было близкое к классическому варианту, что отмечено в скрещивании самки плотвы с гибридным самцом ПЛ (\P П1 х \r ПЛ) (45%:55%), или повышение числа гомозигот ЛЛ с мтДНК и ITS1 фрагментом леща с гибридным

самцом ЛП (\P Л1х \P ЛП1) на стадии личинки. В скрещиваниях, когда самка и самец имели мтДНК разных видов, в потомстве преобладали бэккроссы с гибридным ITS1 фрагментом, что показано в скрещиваниях \P Пх \P ЛП и \P Лх \P ПЛ (табл. 4, рис. 11). Таким образом, различия в отношении классов потомков по ITS1 в возвратных скрещиваниях на гибридного самца могут зависеть от того, совпадает при скрещивании цитотип самки и самца или нет.

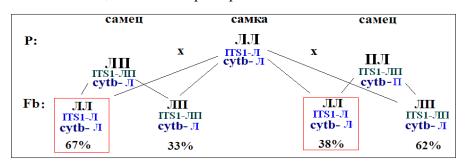
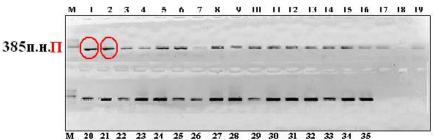


Рис. 11. Отношение классов потомков по ITS 1-фрагменту на стадии личинки в возвратных скрещиваниях на гибридного самца. Скрещивания: \D Лх \D ЛЛ и \D Л1х \D ЛП1

Наследование в скрещиваниях самца чистого вида гибридной В анализирующих скрещиваниях использованы две самки ПЛ4 и ЛП5 и четыре самца чистых видов. Скрещивание гибридной самки $\Pi \Pi$ с самцом плотвы ($\Omega \Pi \Pi Ax \Omega \Pi A$). Генотип родительских особей соответствовал их статусу: гибридного - в случае самки (суt b плотвы, гибридный ITS1) и чистого вида - в случае самца (суt b и ITS1-плотвы). Оба родителя имеют мтДНК плотвы. В потомстве гомозиготы ПП (ITS1 плотвы) составили 54%, гетерозиготы ЛП (ITS1 плотвы и леща) – 46% (табл. 4). При проверке отклонения частот от закона Харди-Вайнберга достоверных отличий не выявлено. Скрещивание гибридной самки ПЛ с самцом класса потомков: гетерозиготы ПЛ (ITS1 гибридный) - 38% и гомозиготы ЛЛ (ITS1 леща) -62%. Расщепление бэккроссов на стадии сеголетка было выражено отношением классов ПЛ и ЛЛ, как 67% и 33%, соответственно. Число гомозигот ЛЛ (ITS1 леща) на стадии сеголетка было снижено вдвое; отметим, что они имеют мтДНК плотвы. Полученные результаты согласуются с данными межгибридного скрещивания (♀ЛПхоЛП) в том, что когда самка и самец различны по мтДНК, в потомстве формируется класс гомозигот с сочетанием рДНК соответствующего родительского вида и мтДНК другого вида; на стадии сеголетка отмечается снижение их численности в 2 раза. Скрещивание гибридной самки ЛП с самцом леща $(\mathcal{P}\Pi\Pi 5x \mathcal{P}\Pi 3)$. Генотип самца леща по видоспецифическим маркерам соответствует статусу чистого вида (cyt b и ITS1 леща). Гибридная самка ЛП5 имеет мтДНК леща и ITS1 фрагмент плотвы. На основании этого можно сделать вывод о жизнеспособности и фертильности гибридов F1 с элиминированными на ранних стадиях развития рибосомными генами одного из родителей. Генетический анализ путем скрещивания данной самки с гомозиготными самцами чистых видов позволяет подтвердить генотип гибридной самки по ITS1 маркеру. В скрещивании самки ЛП5 с самцом леща получено два класса потомков: на стадии личинки гомозиготы ЛЛ составили – 44%, гетерозиготы ЛП - 56% (табл. 4); на стадии сеголетка гетерозиготы ЛП были выявлены в 47% случаев, а гомозиготы ЛЛ - в 53% случаев. Необходимо отметить, что бэккроссы ЛЛ с ITS1 леща, вероятно, имеют гаплоидный набор рибосомных генов, т.к. на хромосоме, переданной от матери, рДНК леща была элиминирована. Скрещивание гибридной самки ЛП с самиом плотвы (\mathcal{L} ЛП $5x\mathcal{L}$ П2). В данном скрещивании генотип самца плотвы соответствовал статусу чистого вида (суt b и ITS1 плотвы). Самка имела мтДНК леща, а самец – мтДНК плотвы. При анализе потомков на стадиях личинки и сеголетка были получены одинаковые результаты: бэккроссы в 100% случаев наследовали генотип самки — мтДНК леща и ITS1 фрагмент плотвы (рис. 12). В данном скрещивании гетерозиготы ЛП и гомозиготы ПП не различимы между собой по используемым маркерам, поэтому, невозможно определить их соотношение, а также оценить их жизнеспособность. Результаты данного скрещивания не только подтверждают факт элиминации одного из родительских кластеров рибосомных генов у межвидовых гибридов F1 на ранних стадиях развития, но и показывают, что перестройки в рДНК, происходящие в соматической ткани, характерны и для клеток генеративного пути, и стабильно наследуются.



Скрещивание гибридной самки ЛП с самцом леща (♀ЛП2х♂Л2). Анализ потомков проведен в скрещивании, где гибридная самка ЛП имела оба ITS1 фрагмента и суt в леща, самец леща соответствовал статусу чистого вида (суt в и ITS1-леща), то есть скрещиваемые самка и самец имели мтДНК леща. От данного скрещивания получено два класса потомков: гомозиготы ЛЛ (ITS1 леща) составили 47%, гетерозиготы ЛП (гибридный ITS1) - 53%. Таким образом, в возвратных скрещиваниях на гибридную самку и гибридного самца в случаях, когда самка и самец имеют мтДНК разных видов, в потомстве на стадии сеголетка преобладают бэккроссы с гибридным ITS1 фрагментом; в скрещиваниях, когда цитотип самки и самца совпадает, отклонения от закономерного расщепления не наблюдается.

2.3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Морфологическая изменчивость родительских особей чистых видов и гибридов F1 находится в пределах изменчивости, характерной для плотвы, леща и гибридов первого поколения (табл. 5). Однако, морфотип гибридной самки ЛП5 (ITS1- плотвы) являлся промежугочным между гибридом F1 и чистой плотвой, что не характерно для гибрида первого поколения: у самки были выявлены отличия по осевому скелету от сибсов, что может быть связано с элиминацией лещовых рибосомных генов на ранних стадиях развития.

Таблица 5. Морфологические признаки бэккроссов от анализирующих скрещиваний ♀ПЛ4х♂Л4, ♀ПЛ4х♂П3 и ♀ЛП5х♂Л3, ♀ЛП5х♂П2х.

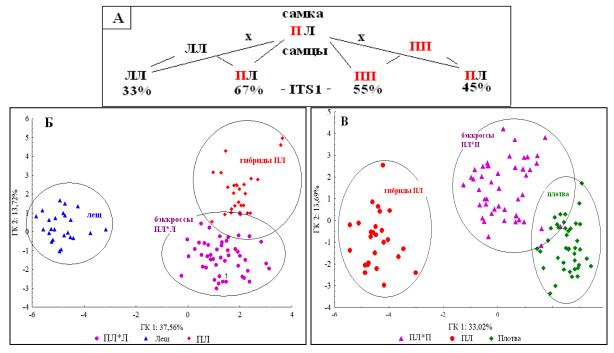
Признак	Ab	Db	I.I.	d.ph.	Va	Vc	Vert
. ЛП*	17	9	51	5-5	14	16	41
ұлП5	13	9	45	6-5	16	15	42
♀ПЛ4	15	10	48	6-5	15	17	43
∂П3	10	10	42	6-5	16	14	40
∂Π2	10	9	42	6-5	16	14	40
₫Л2	26	9	56	5-5	14	18	44
∂Л4	25	9	56	5-5	14	18	44
лп*п	11.1±0.1	9.6±0.07	43.4±0.2	6-5 (74.42%)	16.0±0.1	14.6±0.1	40.8±0.2
лп*л	17.6±0.2	9.3±0.07	51.8±0.4	6-5 (90.91%)	15.9±0.1	15.9±0.1	42.5±0.1
пл*л	18.0±0.2	9.1±0.05	47.5±0.3	6-5 (43.75%) 5-5 (56.25%)	15.1±0.1	17.1±0.1	43.1±0.1
Пл*П	11.8±0.1	9.9±0.05	45.1±0.3	6-5 (72.92%)	15.3±0.1	14.7±0.1	40.7±0.1

^{*-} гибрид ЛП – первого поколения с двумя видоспецифическими ITS1 фрагментами.

Морфологический анализ бэккроссов $\Pi \Pi^* \Pi$ и $\Pi \Pi^* \Pi$ на стадии сеголетка. У бэккроссов $\Pi \Pi^* \Pi$ от скрещивания $\Pi \Pi^* \Pi$ отмечен морфотип, близкий к гибридам F1; преобладает осевой скелет лещового типа (95.8%). Области распределения бэккроссов $\Pi \Pi^* \Pi$ в

пространстве главных компонент и гибридов F1 частично перекрываются (рис. 13Б). В скрещивании ♀ПЛ4х♂ПЗ бэккроссы ПЛ*П наследуют морфотип, близкий плотве, осевой скелет плотвиного типа. В пространстве главных компонент область бэккроссов частично перекрывается с выборкой чистой плотвы (рис. 13В).

При объединении морфологических данных и результатов наследования видоспецифических фрагментов (cyt b, ITS1 рДНК) показано, что в скрещивании, где самка и самец имеют мтДНК одного вида (ПЛ4хП3), в потомстве наследуется морфотип соответствующего родительского вида (плотвы), отклонения в расщеплении по ITS1 не происходит (рис. 13A). В скрещивании, где самка и самец имеют мтДНК разных видов (ПЛ4хЛ4), бэккроссы наследуют гибридный морфотип по типу "F1" и наблюдается преобладание потомков с гибридным ITS1 фрагментом.



Морфологический анализ бэккроссов ЛП*Л и ЛП*П на стадии сеголетка. Бэккроссы были получены от скрещиваний, в которых гибридная самка ЛП5 содержит только ITS1 фрагмент плотвы. Кроме выявленных отличий по осевому скелету и морфотипу, гибридная самка ЛП5 по ряду признаков была более близка к гибриду ПЛ4, чем к гибриду ЛП, содержащему оба ITS1 фрагмента (табл. 5). Отсюда можно сделать вывод, что элиминация материнских лещовых рибосомных генов у гибрида ЛП изменила его морфотип в сторону плотвы. Для бэккроссов ЛП*Л, полученных от скрещивания $$\square$$ ЛП5х $$\square$$ Л3, отмечен морфотип близкий к поколению F1 (рис. 14Б); по типу осевого скелета выделены две группы гибридов Fb: с морфотипом «плотвы» $Va \ge Vc$ (87.5%) и - «леща» Va < Vc (12.5%). В скрещивании $$\square$$ ЛП5х $$\square$$ П2 у потомков выявлен морфотип, близкий плотве; осевой скелет ($Va \ge Vc$) плотвиного типа. Распределение бэккроссов ЛП*П в пространстве главных компонент частично перекрывается с выборкой чистой плотвы (рис. 14В). При анализе значений признаков исследованных групп сеголеток бэккроссов следует отметить сходство потомков от скрещивания ПЛхЛ с ЛПхЛ и от скрещивания ЛПхП с ПЛхП по следующим признакам: I.I, Db, Ab, Vc (табл. 5). Такое объединение, на наш взгляд, может являться следствием

элиминации рибосомных генов леща у гибридной самки ЛП5, что в свою очередь, оказало влияние на формирование собственного морфотипа самки и морфотипа ее потомков. Отметим, что во всех возвратных скрещиваниях на гибридную самку внутригрупповой дифференциации среди потомков не выявлено. Бэккроссы с мтДНК плотвы и рДНК леща от скрещивания ♀ПЛ4х♂Л4 по морфотипу не отличались от остальных сибсов.

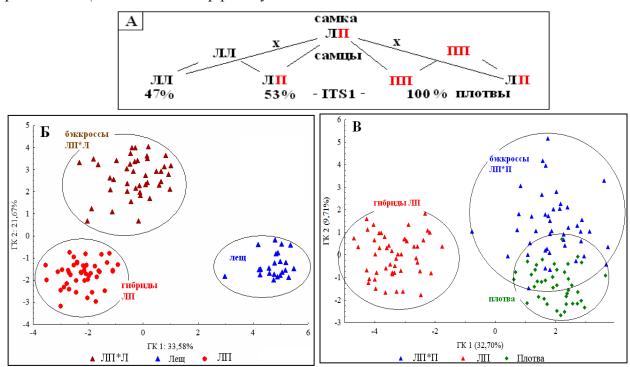


Рис. 14. Отношение классов потомков по ITS1 в возвратных скрещиваниях на гибридную самку ЛП5 (A). Распределение бэккроссов ЛП*Л (Б) от скрещивания ♀ЛП5х♂Л3 и бэккроссов ПЛ*П (В) от скрещивания ♀ЛП5х♂П2 в пространстве главных компонент по совокупности морфологических признаков. Для анализа использованы выборки гибридов ЛП (сибсы гибридной самки ЛП5), плотвы и леща.

2.4. АНАЛИЗ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Все пары производителей были гетерозиготами по микросателлитным маркерам, причем у особей, задействованных в индивидуальных скрещиваниях, аллели микросателлитных локусов не совпадали. *Анализ гибридов F1, бэккроссов и гибридов F2* в каждом отдельном скрещивании показал, что все особи гибридного потомства принадлежали конкретной родительской паре. Носителей исключительно материнских или отцовских аллелей среди потомков с одним ITS1 фрагментом мы не обнаружили: все гибриды были представлены гетерозиготами, содержащими один материнский и один отцовский аллели (рис. 15).

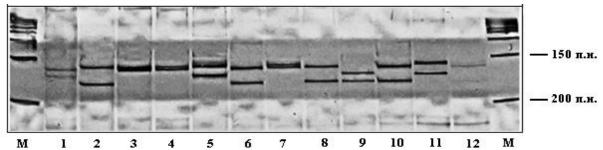


Рис. 15. Скрещивание ♀ЛП2х♂Л2. Анализ потомков ЛП*Л по микросателлитному локусу Gyp23. 1- самка ЛП, 2-самец леща, 3-12- гибриды. М- маркер молекулярных масс 50 п.н.

3. Генетическая изменчивость неспецифических эстераз

Обнаружение возможных последствий межвидовой гибридизации леща и плотвы и выявление геномных эффектов производили на уровне фенотипов и частот аллелей неспецефических эстераз (НЭ). Для сравнения выполнен анализ НЭ синца, как

близкородственного вида, гибридов которого с плотвой в естественных условиях не обнаружено (Kasansky, 1930, 1937).

Лещ (А. brama). Для удобства сравнения наших данных с литературными анализ популяционной изменчивости сывороточных эстераз проводили на уровне фенотипов. Ранее в крови леща О. Нейманом (1965) обнаружена - одна, а М. Таммертом (1980) - две зоны эстеразной активности. Нами при анализе тканей леща выявлено три зоны эстеразной активности в печени (Est-1; Est-2; Est-3, в порядке увеличения электрофоретической подвижности), по две зоны в сердечной, скелетной мышцах и сыворотке (Est-1; Est-2). При определении фенотипов в сыворотке учитывали обе зоны активности. Зона Est-2 расположена в области β-глобулинов, присутствует у всех особей и характеризуется высокой активностью. Первый фенотип с активностью только в зоне Est-2 широко представлен в исследуемых выборках - 0.62 (в 1980 г. доля этого фенотипа составляла уже 0.76). В некоторых случаях было отмечено разделение данной зоны на два компонента "а" и "в", что соответствует 4-му фенотипу (частота его встречаемости 0.02). Второй (0.38, в 1980 г. - 0.21), третий (0.14) и пятый (0.1) фенотипы описаны с учетом активности в зонах Est-1 и Est-2 (рис. 16). Третий и четвертый фенотипы были описаны в работе Е.В. Кузьмина (1985), в наших исследованиях был выявлен пятый фенотип. Для зоны Est-2 получена точная повторяемость активности дополнительных фракций у одних и тех же особей в разных тканях, поэтому, вероятно, что разделение зоны на два компонента находится под генетическим контролем, а не является артефактом.

фенотипы	1	2	3	4	5
Est-1)	a
Est-2	_			_	

Рис. 16. Фенотипы неспецифических эстераз сыворотки крови леща

Тест на гетерогенность показал отсутствие достоверных различий между выборками Горьковского, Углического и Рыбинского водохранилищ за 1996 год. В то же время две выборки разных лет из Углического в-ща достоверно различались (p<0.05). При сравнении наших данных с результатами 1980 года были получены достоверные различия между выборками по всем изученным водохранилищам (p<0.05). При изучении электрофореграмм НЭ разных тканей четырех выборок из всех водохранилищ в 1997 году (всего 135 особей) в зоне Est-2 был обнаружен еще один редкий аллельный вариант, не встреченный ранее. Тест на гетерогенность не выявил достоверных различий между выборками ($\chi^2_{\rm G} = 0.04$; $\chi^2_{\rm st} = 1.86$; $v_{\rm G} = 7.16$). Из шести возможных фенотипов выявлено три, преобладали гомозиготы ВВ (табл. 6). Таблица 6. Частоты генотипов локуса Est-2 леща, плотвы и синца (p<0.05).

Локус Вид	Гоп	Гол. Кол-во, Частоты генотипов							
	Год	ШТ.	AA	BB	CC	AB	AC	ВС	
лещ	1997	268	-	0.94	-	0.02	-	0.04	
	1980	192	-	0.996	-	0.004		-	
Est-2	плотва	1996	30	0.07	0.17	0.1	0.43	0.23	-
синец	1996	93	0.24	0.27	-	0.49	-	-	
	1980	90	0.30	0.24	-	0.46	-	-	

Плотва (R. rutilus). Выявлено отсутствие тканеспецифичности по зонам активности Est-2 и Est-3 на основании сходства фракций на зимограммах печени, сердечной и скелетной мышц.

Зона *Est*-2 представлена тремя аллелями, из шести ожидаемых генотипов отмечено пять, преобладали гетерозиготы (табл. 6).

Синец (A. balerus). Выявлено три зоны эстеразной активности в печени (Est-1; Est-2; Est-3) и по две зоны в сердечной, скелетной мышцах и в сыворотке (Est-1; Est-2). На основании сходства фракций в анализируемых тканях по зоне Est-2 отмечено отсутствие тканеспецифичности. Зона Est-2 у синца представлена двумя аллелями. При сопоставлении частот встречаемости генотипов между выборками 1981 и 1996 годов статистический анализ показал отсутствие достоверных различий (табл. 6).

Таким образом, зона Est-2 по электрофоретической подвижности совпадает у всех исследованных видов и характеризуется отсутствием тканеспецифичности; детерминирована по трехаллельной системе кодирования у леща и плотвы, по двухаллельной - у синца, считается продуктом самостоятельного локуса. При изучении стабильности популяции во времени сравнительный анализ показал, что в популяции синца Рыбинского водохранилища за пятнадцатилетний промежуток времени (1981-1997 г.г.) существенных изменений в распределении фактических частот встречаемости генотипов локуса Est-2 не произошло, тогда как у леща выявлены достоверные различия между выборками. Полученные результаты, на наш взгляд, можно рассматривать, как последствия отдаленной гибридизации плотвы и леща.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемые в настоящей работе RAPD-маркеры в комплексе с видоспецифическими маркерами ядерного генома (ITS1 рДНК) и мтДНК (cyt b) позволяют не только идентифицировать реципрокных гибридов F1 и гибридов Fb, но и дифференцировать их по направлению скрещивания. Геномное разнообразие гибридов первого и последующих поколений лежит в пределах интервала изменчивости, присущего родительским видам, хотя в целом, по уровню генетической изменчивости гибриды F1 и Fb ближе к наиболее полиморфному из родительских видов, т.е. к плотве. Количество RAPD-фрагментов в индивидуальных спектрах гибридов выше, чем у плотвы и леща, т.к. гибридный спектр представляет собой либо различные сочетания RAPD-фрагментов родительских особей, что характерно для мономорфных локусов и повторов ДНК, либо независимо наследуемые варианты фрагментов ДНК только одного из родительских видов, что, вероятно, связано с гетерозиготностью данного уникального полиморфного локуса. Кроме того, для гибридов характерно появление "неродительских" фрагментов, число которых в нашем исследовании составило 2.4%. Появление "неродительских" RAPD-фрагментов объясняют образованием гетеродуплексов между аллельными RAPD-продуктами (Hunt, Page, 1992; Davis et al., 1995), расщеплением родительских гетерозигот ПО доминантным аллелям, процессами реорганизации генома (внутригеномная рекомбинация между разными аллелями родительских форм) при разных типах скрещивания и появлением точечных мугаций в местах посадки праймеров. Мономорфные межвидовые RAPD-фрагменты наследуются всеми группами гибридов, в то время как мономорфные видоспецифические фрагменты наследуются в зависимости OT направления скрещивания, как предполагают, ЭТО опосредованным влиянием пол-связанных локусов (Рожкован и др., 2005). Отмечено, что бэккроссы проявляют большее сходство спектров с гибридами F1, чем с родительскими видами.

В исследовании обнаружена и подтверждена анализирующими скрещиваниями элиминация рибосомных генов одного из родительских видов у части гибридов F1 на ранних стадиях

развития. Показано, что перестройки в кластере рибосомных генов у гибридов F1 характерны не только для соматической ткани, но и для клеток генеративного пути и стабильно наследуются. Гибридная природа всех потомков F1, как содержащих оба родительских ITS1 фрагмента, так и имеющих только один ITS1 фрагмент, полностью подтверждается данными по анализу микросателлитных локусов.

Доминирование рибосомных генов одного из родительских видов у гибридов F1 было обнаружено М. Навашиным (1934) на посттранскрипционном уровне у растения рода *Crepis*; в литературе сообщается о данном феномене также у гибридов лягушек (Хепория), дрозофилл (Drosophila) и соматических клеток (Reeder, 1985; Pikkard, 2003; Preuss, Pikaard, 2007). В настоящей работе доминирование рибосомных генов впервые выявлено и изучено на уровне генов у гибридов рыб. Мы полагаем, что элиминация одного из наборов рДНК со стадии гаструлы является следствием согласования работы контаминированных чужеродных геномов на этапе инициации ядерного генома гибридного зародыша. Известно, что именно на этапе бластуляции происходит включение собственного ядерного генома зародыша и запуск морфогенеза (Костомарова, Ротт, 1970; Конюхов, 1980; Кирпичников, 1987; Корочкин, 1999). Синтез белка зародыша до стадии бластулы идет с материнских мРНК и возникновение межгеномных конфликтов на уровне рДНК вполне закономерно, поскольку рассматриваемый кластер рибосомных генов, непосредственным образом связан с процессами инициации сплайсинга и синтезом рибосом. Ядерный геном плотвы активируется раньше лещового (Крыжановский, 1968); вероятно, поэтому именно в скрещиваниях, где материнским видом был лещ выявлено наибольшее количество гибридов с элиминацией ITS1 фрагмента (3%-28% в разных скрещиваниях), по сравнению с реципрокными скрещиваниями (1.5%), что говорит о разном вкладе отцовской и материнской наследственности. Показано, что число подобных особей зависит от стадии онтогенеза: так на стадии "эмбрион перед вылуплением" отмечены все три типа гибридов по ITS1 региону.

Обнаруженные перестройки в рДНК у гибридов F1 вероятней всего являются результатом накопления структурных и регуляторных различий в этом участке генома у исследуемых видов. Преодоление негомологичности геномов решается путем формирования генетической программы системного ответа организма на структурные преобразования генома (Левонтин, 1978; Чадов, 1981). Мы предполагаем, что при образовании зиготы возможны три варианта ответа: первый - элиминация нежизнеспособных гибридов; второй - жизнеспособные гибриды как результат удачного сочетания гамет в зиготе, у которых присутствуют оба родительских ITS1 фрагмента; и третий вариант - жизнеспособные гибриды с одним ITS1 фрагментом, генетическая регуляция развития которых подвержена коррекции в соответствии с тем, рибосомный кластер какого из родительских видов был элиминирован (либо по - плотвиному, либо по - лещовому типу). Как свидетельствуют данные по экспрессии ферментов, скоростям и срокам морфогенеза (Крыжановский, 1968; Лапушкина, 2002), программы эмбрионального развития плотвы и леща существенно отличаются. Гибриды, как правило, наследуют один родительский тип генетической регуляции развития, что объединяет их между собой согласно направлению скрещивания. Отмечено, что гибридная самка ЛП5 с рДНК плотвы отличалась по морфологическим признакам от сибсов и была более близка к гибриду ПЛ, чем к ЛП, который содержит оба видоспецифических ITS1 фрагмента (табл. 5). Очевидно, что элиминация одного из кластеров рибосомных генов у гибридов F1 на начальных стадиях развития оказывает влияние на морфотип.

Мультигенное семейство рДНК подвергнуто механизмам согласованного развития через генную конверсию и неравный кроссинговер (Elder, Turner, 1995; Li, 1997), гибридизация или полиплоидия могут нарушать эти механизмы, что приводит к внутри индивидуальному полиморфизму (Hughes et al., 2002; Wissemann, 2003). Наблюдаемые эффекты и явление элиминации в целом, вероятно, являются прямым следствием гомогенизации структуры «родственных», но существенно различающихся пар генов рДНК к одному из родительских типов при согласовании работы геномов разных видов. В эволюционном плане конверсия имеет прямое отношение к поддержанию стабильности генетического материала, которое осуществляется путем предотвращения кроссинговера между дивергировавшими ДНК. Поскольку значительная часть повторов локализована в гетерохроматине, где мейотический кроссинговер в норме не происходит, считается, что неравные обмены могут выполнять корректирующие функции только при митотических делениях зародышевой линии клеток (Жученко, Король, 1985).

В настоящее время накоплены многочисленные молекулярные данные о том, что генная конверсия играет важную роль в увеличении и уменьшении содержания ДНК (Radding, 1982). На наш взгляд, разница в количестве ДНК может являться возможной причиной межгеномных конфликтов гибридизирующих видов. Показано, что размер генома леща превышает размер генома плотвы (2.0 и 2.6 Пг/2С для плотвы и леща, соответственно (Гинатулин, 1984)). Поскольку число хромосом у этих видов одинаково, умножение ДНК могло происходить за счет тандемных дупликаций (Жученко, Король, 1985). Считается, что накопление ДНК, в процессе коэволюционных взаимоотношений симпатрических видов использует более примитивный вид, что лежит в основе длительных модификаций, индуцированных экстремальными условиями внешней среды. Специализация вида при этом будет сопровождаться сбросом факультативной ДНК или изменением ее топографии, что также ведет к изменению систем генной регуляции (Голубовский, 2000). Если учитывать, что межвидовая гибридизация сама по себе является стрессовым фактором, то перманентное скрещивание могло способствовать накоплению ДНК у леща и быть причиной генетического полиморфизма локуса *Est-2* леща, выявленного в исследовании.

Известно, что рДНК подвержена различным типам рекомбинаций, но каждый организм поддерживает определенное число копий рДНК, что указывает на присутствие механизма для регулирования их числа (Kobayashi et al., 2006). Доказано, что если происходят удаления или вставки повторов, то число копий восстанавливается к уровню дикого типа (Rodland, Rassell, 1982; Kobayashi, 1998). Тандемное строение рДНК и количество повторов оказывается важным для оптимальной длительности митоза, что необходимо для обеспечения генетического гомеостаза, вероятно, посредством поддержания способности клетки к коррекции ошибок при расхождении хромосом. Возможно, явление элиминации рибосомного кластера в гибридном геноме при согласовании чужеродных геномов, является одним из механизмов сохранения видоспецифичности геномов скрещивающихся видов.

Анализ изменчивости локусов мтДНК демонстрирует высокий уровень дивергенции митохондриальных геномов плотвы и леща (Semenova et al., 2006; Hayden et al., 2011). Нарушения наследования мтДНК у гибридов не обнаружено, однако, при объединении данных по наследованию маркеров ядерного генома (ITS1) и мтДНК (суt b) были выявлены некоторые особенности. В направлении скрещивания самки леща с самцом плотвы показано: 1. отсутствие единообразия в потомстве F1, как результат элиминации одного из родительских ITS1 фрагментов, и наличие гибридов, в геноме которых сочетаются мтДНК

одного вида (леща) с рибосомными генами другого (плотвы); 2. единообразие в потомстве при возвратном скрещивании при условии, что у гибридной самки элиминированы рибосомные гены одного из родительских видов; причем, образуемый класс гомозигот ПП имеет восстановленный диплоидный набор рибосомных генов плотвы и мтДНК леща; 3. отклонение в расшеплении получаемых классов потомков в межгибридных и возвратных скрещиваниях, когда самка и самец имеют мтДНК разных видов. Г. Мендель (1923) отмечал, что у гибридов и их потомков не должно происходить заметного нарушения в плодовитости, отклонения в расшеплениях будут возникать, если классы имеют разную жизнеспособность. При анализе стадий личинки и сеголетка выявлено снижение численности класса гибридов с ITS1 фрагментом одного вида и мтДНК другого в межгибридных и возвратных скрещиваниях на гибридную самку (ЛПхПЛ, ПЛхЛ). На основании этих данных можно сделать вывод о снижении жизнеспособности данного класса бэккроссов. При реципрокных возвратных скрешиваниях наблюдается дифференциация класса потомков (ЛЛ) по характеру сочетания элементов ядерного генома и мтДНК (рис. 17). Класс бэккроссов с ядДНК одного вида и мтДНК другого формируется только при одном направлении скрещивания ПЛхЛ (рис. 17, скрещивание 4). Именно этим путем при гибридизации осуществляется интрогрессия мтДНК. Очевидно, что сценарии гибридизации в направлении скрещивания на гибридного самца и гибридную самку, учитывая разницу цитотипов самки и самца, будут качественно отличаться друг от друга и иметь разные эволюционные последствия и биологический смысл.

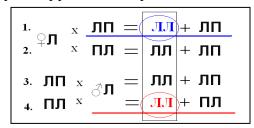


Рис. 17. Возвратные скрещивания леща с гибридными самками и самцами. Л и П – обозначение гаплоидных геномов леща и плотвы.

Ранее при анализе морфологических признаков бэккроссов от скрещиваний на гибридного самца показано наличие в потомстве трех дискретных классов: с морфотипом родительского вида, с морфотипом "гибридов F1" и с промежуточной между ними морфологией (Яковлев и др., 2000). В настоящей работе в скрещиваниях на гибридную самку внугригрупповой обнаружено. дифференциации бэккроссов не Однако, при анализе данных морфологической изменчивости и наследованию мтДНК у бэккроссов было отмечено, что в скрешиваниях, когда самка и самец имели мтДНК разных видов, потомство наследовало гибридный морфотип по типу "F1". В случае, когда мтДНК гибридной самки и самца чистого вида совпадали, потомки имели морфотип, близкий соответствующему родительскому виду.

В исследовании экспериментальным путем показано, что при определенных экологических условиях в природе будет поддерживаться какое-то одно направление скрещивания и, как следствие, гибриды одного генотипа. Так, в силу отсутствия территориального поведения у самцов плотвы при нересте, в естественных условиях более обычны скрещивания самки леща с самцом плотвы (ЛхП), и далее — гибридной самки ЛП с самцом плотвы (ЛПхП); при этом будут преобладать гибриды с мтДНК леща и ядерным ITS1 плотвы. Показано, такой генотип могут иметь не только бэккроссы, но и гибриды F1. В случае скрещивания гибридной самки ЛП с ITS1 плотвы (сут в леща) с самцом плотвы, доля бэккроссов с мтДНК леща и ITS1 плотвы возрастает до 100%; все потомство от данного скрещивания имеет морфотип "плотвы" (рис. 14). В этих условиях возникают молекулярно-генетические предпосылки для

интрогрессии мтДНК леща в геном плотвы с последующей фиксацией чужеродного митотипа в геноме реципиентного вида посредством дальнейшей гибридизации.

ВЫВОДЫ

- 1. На основании анализа ядерных маркеров (RAPD, ITS1 рДНК, микросателлиты, неспецифические эстеразы) и мтДНК (cyt b) показана четкая дифференциация чистых видов плотвы (*Rutilus rutilus*), леща (*Abramis brama*) и их межвидовых гибридов F1, Fb, а также возможность идентификации гибридов с учетом направления скрещивания.
- 2. В геномах гибридов наблюдается увеличение количества RAPD фрагментов по сравнению с родительскими особями. Оно вызвано не только наследованием материнских и отцовских локусов, но и появлением гибрид специфических фрагментов ДНК, что свидетельствует об увеличении уровня геномной вариабельности гибридных геномов.
- 3. В первом поколении межвидовых гибридов леща и плотвы у части потомков происходит элиминация кластера рибосомных генов одного из родительских видов. Анализирующими скрещиваниями показано, что перестройки в рДНК характерны, как для соматической ткани, так и для клеток генеративного пути. Установлено, что начиная с гаструлы и на всех последующих стадиях онтогенеза, наблюдается наличие трех типов потомков F1 по ITS1 региону: гибридный присутствие обоих родительских видоспецифических фрагментов ITS1 плотвы и леща, лещевый присутствие только лещевого ITS1 фрагмента, плотвиный присутствие только плотвиного ITS1 фрагмента.
- 4. В скрещиваниях, где материнским видом был лещ, гибриды с одним ITS1 фрагментом составляют от 28% в период раннего развития до 3% на стадии сеголетка в отличие от реципрокного скрещивания, где обнаружено только 1.5% гибридов с одним ITS1 фрагментом на ранних стадиях развития, что свидетельствует о разном вкладе материнского вида в поддержание стабильности генома.
- 5. При интеграции молекулярных и морфологических данных у бэккроссов от скрещивания на гибридную самку показано: в скрещиваниях, когда самка и самец имели мтДНК разных видов, все потомство наследовало гибридный морфотип по типу "F1" и преобладали бэккроссы с гибридным ITS1 фрагментом (70%). В скрещиваниях, когда мтДНК самки и самца совпадали потомки имели морфотип близкий чистому виду, классы потомков по ITS1 были представлены в равном отношении или имели преимущества гомозиготные особи,. По анализу морфологических признаков показано, что элиминация рибосомных генов одного из родительских видов у гибрида F1 оказывает влияние на морфотип.
- 6. Анализ неспецифических эстераз плотвы, леща и синца из природных популяций показал достоверное изменение частот аллелей анцестрального локуса *Est*-2 леща за пятнадцатилетний промежуток времени, что может рассматриваться как результат межвидовой гибридизации.

Список опубликованных работ

Статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК:

- 1. Слынько Ю.В., Столбунова В.В. Элиминация родительского ITS1 фрагмента рДНК в первом поколении межвидовых гибридов леща *Abramis brama* (*L*.) и плотвы *Rutilus rutilus* (*L*.). Доклады Академии наук. 2010. т.430. №1. с. 139-141.
- 2. Слынько Ю.В., Карабанов Д.П., Столбунова В.В. Генетический анализ внугривидовой структуры тюльки, *Clupeonella cultiventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterigii: Clupeidae). Доклады Академии Наук. 2010. т. 433. № 2. с. 283-285.
- Статьи в других изданиях:

 1. Слынько Ю.В. Лгебуалз
- 1. Слынько Ю.В., Дгебуадзе Ю.Ю., Кияшко В.И., Терещенко В.Г., Халько В.В., Столбунова В.В., Слынько Е.Е., Ворошилова И.С., Боровикова Е.А., Касьянов А.Н. Эколого-генетические последствия расселения чужеродных видов и организмов в пресноводных экосистемах России // Биологическое разнообразие: Генофонды и генетическое разнообразие. Материалы отчетной конференции. М.: ИОГен. 2011. с. 85-88.
- 2. Столбунова В.В. Особенности наследования локусов ядерного генома и мтДНК при отдаленной гибридизации плотвы (Rutilus rutilus L.) и леща (Abramis brama L.). Материалы IV

- Международной ихтиологической научно-практической конференции «Частные проблемы теоретической и практической ихтиологии». Одесса. 2011. с. 219-222.
- 3. Столбунова В.В., Слынько Ю.В. Особенности наследования рибосомного кластера рДНК и локуса мтДНК при возвратных скрещиваниях гибридов леща(*Abramis brama L.*) и плотвы (*Rutilus rutilus L.*). Материалы XXV Любищевских чтений. Современные проблемы эволюции. Ульяновск. 2011. с. 446-450.
- 4. Slyn'koY.V, Stolbunova V.V., Koduhova Y.V. Genetic consequences of interspecific hybridization on the example of roach and bream. The III International Symposium "INVASION OF ALIEN SPECIES IN HOLARCTIC (BOROK-3) // Myshkin-Borok, p. 87.
- 5. Столбунова В.В., Слынько Ю.В. Особенности наследования кластера рибосомных генов у гибридов леща (*Abramis brama* L.) и плотвы (*Rutilus rutilus L.*). Материалы II Международной ихтиологической научно-практической конференции". Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии". Севастополь. 2009. с. 150-152.
- 6. Столбунова В.В., Карабанов Д.П. Внутривидовая структура черноморско каспийской тюльки Clupeonella cultriventris (Nordmann, 1840) по результатам аллозимной и RAPD-изменчивости. Материалы XXVIII Международной конференции: Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера. Петрозаводск. 2009. с. 528-531.
- 7. Столбунова В.В., СлынькоЮ.В. Обнаружение и молекулярно-генетические доказательства индуцированного гиногенеза у леща (*Abramis brama L.*). Тезисы международ. науч. конф." Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб". Санкт-Петербург. 2008. с. 23-24.
- 8. Столбунова В.В. Неспецифические эстеразы и RAPD-фингерпринт некоторых представителей семейства карповых (CYPRINIDAE) Верхней Волги. Материалы II Всероссийской конференции "Экологические системы: фундаментальные и прикладные исследования". Нижний Тагил. 2008. с. 237-241.
- 9. Столбунова В.В., Слынько Ю.В. RAPD-фингерпринт плотвы (Rutilus rutilus L.) и леща (Abramis brama L.) // Материалы XIII молод. науч. конф. "Актуальные проблемы биологии и экологии". Сыктывкар. 2007. с. 233-236.
- 10. Столбунова В.В., Хлыстов Д.Н. Неспецифические эстеразы сыворотки крови леща *Abramis brama* и синца *Abramis ballerus* Верхней Волги // Материалы международ. науч. конф. "Ихтиологические исследования на внутренних водоемах". Саранск. 2007. с. 162-164.
- 11. Столбунова В.В., Слынько Ю.В. RAPD-изменчивость плотвы, леща, их гибридов F1 и бэккроссов. Материалы IV международ. науч. конф. «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах. Днепропетровск. 2007. с. 178-180.
- 12. Ludanny R., Chrisanfova G., Stolbunova V., Slynko Y., Semyenova S. Comparative mitogenomic study of some Cyprinidae species (common carp, bream and roach) // XII European Congress of Ichtyology. Cavtat (Dubrovnik), Croatia. Zagreb. 2007. P. 37.
- 13. Столбунова В.В. RAPD-изменчивость плотвы, леща, их гибридов F1. Тезисы XIII международной школы конференции «Биология внутренних вод». Борок: ИБВВ РАН. 2007.с. 60-61.
- 14. Луданный Р.И., Хрисанфова Г.Г., Столбунова В.В., Слынько Ю.В., Рысков А.В., Семенова С.К.. Митогеномика пресноводных рыб семейства карповых (CYPRINIDAE). Материалы Всерос. рабочего совещания "Штрих кодирование видов рыб в России на основе ДНК. Интеграция в глобальную программу Fish-BOL". ИБМ РАН. Владивосток. Россия. 2007. с. 5. http://www.imb.dvo.ru/misc/barcoding/files/Workshop2007/Ludanny_et_al.Workshop2007Report_Rupps