

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности «8D05104 – Генетика»

АДЫРБЕКОВОЙ КАМИЛЫ БОЛАТҚЫЗЫ

Генетический анализ усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна на основе изменчивости ядерных и митохондриальных ДНК маркеров

Общая характеристика диссертационной работы. В диссертационной работе изучена генетическая структура усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна. Проведен генетический анализ усачей на основе изменчивости ядерных и митохондриальных ДНК маркеров.

Актуальность исследования. В Арало-Сырдарьинском бассейне встречается два вида усачей: аральский *L. brachycephalus* и туркестанский *L. conocephalus*. В прошлом усачи - ценные промысловые виды Аральского моря и реки Сырдарьи. Огромное негативное влияние на размножение популяции усачей оказало зарегулирование стока рек Сырдарьи и Амударьи, впоследствии это привело к катастрофическому сокращению численности. Плотины без рыбоходов преградили усачу пути к традиционным нерестилищам и сократили его численность, поэтому усачи Арало-Сырдарьинского бассейна занесены в Красную книгу РК, а также включены в IUCN Red list (МСОП), где имеют охранный статус *Vulnerable* (уязвимые). Ввиду их статуса и во избежание потенциального ущерба популяциям и поддержания экологического принципа «поймал - отпусти» проводился отбор проб для генетического анализа. Виды *L. brachycephalus* и *L. conocephalus* имеют в значительной мере совпадающие ареалы. Морфологически эти виды очень близки и они сложно поддаются видовой идентификации, уточнение видового статуса и систематического положения усачей (предложения по исследованию в Красной Книге Республики Казахстан) требуют молекулярно-генетических исследований. К тому же, вопросы выяснения видовой принадлежности туркестанского усача *L. conocephalus* остается до сих пор не изученным. Вероятно, в будущем популяция усачей будет поддерживаться в основном за счет искусственного воспроизводства с учетом оценки генетического разнообразия. До настоящего времени специализированных генетических исследований по ценным, редким и эндемичным видам рыб не проводилось.

Объекты исследования. Усачи рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна.

Цель исследования. Провести генетический анализ и оценить генетическое разнообразие усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна на основе ядерных и митохондриальных ДНК маркеров.

Задачи исследования.

1. Провести картирование мест обитания усачей в Арало-Сырдарьинском бассейне. Изучить биологические и морфологические характеристик.

2. Оценить генетическое разнообразие усачей Арало-Сырдарьинского бассейна на основе использования микросателлитных локусов.
3. Изучить генетическую структуру рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 из Арало-Сырдарьинского бассейна на основе ядерных маркеров.
4. Оценить внутрипопуляционное генетическое разнообразие аральского усача по результатам гена *Cytb* митохондриальной ДНК.
5. Провести филогенетический анализ рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 с помощью гена *Cytb* митохондриальной ДНК.
6. Провести генетическую паспортизацию ремонтно-маточного стада аральского усача *L.brachycephalus* содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» на основе ядерных и митохондриального ДНК маркеров.

Методы исследования. В ходе работы были использованы картографические, морфометрические, молекулярно-генетические и статистические методы.

Научная новизна исследования. Впервые обширно и углубленно было оценено генетическое разнообразие и изучена структура рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 из Арало-Сырдарьинского бассейна на основе 15 из 17 информативных микросателлитных локусов ДНК. Обнаружены частные аллели, для рода позволяющие идентифицировать изученные виды. Впервые определена нуклеотидная последовательность мтДНК-маркера *Cytb* усачей, изучено внутрипопуляционное генетическое разнообразие и построена сеть гаплотипов для аральского усача, проведен филогенетический анализ рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 по результатам которых проведена их дифференциация и уточнен видовой статус *L.conocephalus*. Впервые проведена генетическая паспортизация ремонтно-маточного стада аральского усача *L.brachycephalus* содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» на основе 4 микросателлитных локусов и гена *COI* митохондриальной ДНК.

Теоретическая значимость. Поскольку исследование находится на стыке генетики и ихтиологии, полученные результаты могут иметь влияние на развитие данных областей науки, как в фундаментальном, так и прикладном аспекте. Полученные результаты способствуют расширению знаний о генетической структуре редких и исчезающих видов ихтиофауны Казахстана и могут быть использованы в эволюционной биологии (микроэволюционные процессы), популяционной генетике, в систематике рыб, сравнительной филогенетике, вопросах видообразования и выявления ихтиогеографических закономерностей в бассейнах Центральной Азии, где распространены усачи.

Практическая значимость. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы для разработки эффективных, научно-обоснованных планов по сохранению и восстановлению усачей природоохранными, рыбохозяйственными, и другими организациями, деятельность которых направлена на охрану, воспроизводство и рациональное использование рыбных ресурсов. Особенно важны полученные данные при планировании реинтродукции усачей, искусственном разведении вида, требующем учета популяционно-генетической структуры, для предотвращения деградации генофондов вида и критического исчезновения в будущем.

Проведенная генетическая паспортизация РМС аральского усача *L. brachycephalus* необходима для направленного формирования производителей и дальнейшего их использования при искусственном воспроизводстве для выращивания жизнестойкого рыбопосадочного материала при зарыблении водоемов. Разноплановые комплексные молекулярно-генетические исследования необходимы для сохранения генофонда и развития аквакультуры и доказывают необходимость их использования на рыбопитомниках в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Впервые в исследованных точках отлова (близ г. Кызылорда и рисовые чеки) поймано четыре экземпляра туркестанского усача, что предполагает широкий ареал их распространения. Усачи двух видов близки друг к другу по совокупности морфо-биологических признаков, большинство из которых перекрываются.

2. Апробировано 17 новых специфичных микросателлитных локусов для рода *Luciobarbus* Heckel, 1843, из них 15 оказались информативными для оценки генетического разнообразия.

3. Изучена генетическая структура, основанная на ядерных маркерах, которые эффективно разграничили виды усачей, также они могут быть применены для внутриродовой генетической идентификации. Выявлено, что в пределах ареала у некоторых особей аральского усача обнаружены ядерные генотипы туркестанского усача. Отмечены частные аллели для туркестанского усача, такие как: M1447, M0244 и M4215 которые демонстрируют четкую дифференциацию при разделении их на кластеры.

4. При оценке внутрипопуляционного генетического разнообразия и подсчете индексов гаплотипного разнообразия, всего выявилось 19. Филогенетический анализ по Байесу и методу максимального правдоподобия для гена *Cytb* подтвердил наличие четырёх основных филогрупп среди проанализированных особей.

5. По результатам филогенетического анализа рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 на основе гена *Cytb* митохондриальной ДНК проведена их дифференциация и уточнен видовой статус туркестанского усача, который является не подвидом, а самостоятельным видом.

6. Впервые проведена апробация генетической паспортизации ремонтно-маточного стада аральского усача *L. brachycephalus* содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» на основе 4 из 10 ядерных маркеров и гена *COI* митохондриальной ДНК.

Основные результаты исследований и выводы:

1. По результатам картирования мест обитания усачей в Арало-Сырдарьинском бассейне, территория выборки охватывала большую часть известного ареала распространения.

Полученные значения коэффициента вариации показывают, что признаки в сравнении имеют низкую вариабельность среди двух изучаемых видов. Большинство CV меристических и пластических признаков составили менее 15%, что потребовало дополнительные молекулярные подходы.

2. Апробировано 17 новых специфичных микросателлитных локусов для рода *Luciobarbus* Heckel, 1843, из них 15 оказались информативными для оценки генетического разнообразия усачей и по количеству аллелей на 15 локусов составили от 2 до 12, со средним значением 6. Общее количество аллелей составило 90. Высокие значения общей гетерозиготности выявлены по локусам с наибольшим числом аллелей от 8 до 12: *M2044*, *M4215*, *M4474*, *M1287* и *M3444*, а два локуса *M3318* и *M4455* явились мономорфными и были исключены из последующих анализов. По всем показателям генетического разнообразия, включая среднее количество аллелей на локус, эффективное число аллелей и гетерозиготность, *L. brachycephalus* с плотины Басыкара демонстрировала более высокие значения по сравнению со всеми точками отбора проб, а точка наиболее близкая к устью Аральского моря, имела наименьшее генетическое разнообразие.

3. Генетическая структура, основанная на ядерных маркерах для представителей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 выявило 5 кластеров ($K = 5$), байесовский кластерный анализ на основе программного обеспечения STRUCTURE v2.3.4. Особи отловленные в близ г. Кызылорда и рисовых чеках были идентифицированы как аральский усач, но генетический структурный анализ доказал, что они принадлежат к другому виду - туркестанскому усачу, которые отмечены впервые в этих местах бассейна. Отмечен низкий уровень интрогрессии генотипов туркестанского у аральского усача в байесовском кластере, а у туркестанского не выявлено вовсе генотипов аральского усача, что указывает на ограниченный генетический обмен между двумя видами. Отмечены частные аллели для туркестанского усача, такие как: *M1447*, *M0244* и *M4215* которые демонстрируют четкую дифференциацию при разделении их на кластеры.

4. По результатам секвенирования полного митохондриального гена *Cytb* (1141 п.о.) сконструирована сеть гаплотипов и при подсчете индексов гаплотипного разнообразия, всего выявилось 19. Филогенетический анализ по Байесу и методу максимального правдоподобия для гена *Cytb* подтвердил наличие четырёх основных филогрупп. Таким образом, можно утверждать что *L. brachycephalus* имеет высокое генетическое внутривидовое разнообразие.

5. На основании последовательностей *Cytb* мтДНК было построено методом NJ (Neighbor-Joining) филогенетическое древо аральского усача *L. brachycephalus*, туркестанского усача *L. conocephalus* и усача булат-маи *L. capito* в сравнении с полученными нуклеотидными последовательностями и образцов из GenBank. На древе образовались две большие клады, одна из которых дифференцирована как *L. brachycephalus*, а другая - клада с *L. capito* и *L. conocephalus*. Таксономический статус туркестанского усача *L. conocephalus* в Казахстане вызывает споры. Изученные автором образцы туркестанского усача из Арало-Сырдарьинского бассейна, р. Бадам присоединились к туркестанскому усачу из р. Хари (Иран), что подтверждает видовой статус туркестанского усача, который является не подвидом (*Barbus capito conocephalus* или *Luciobarbus capito conocephalus*), а самостоятельным видом.

6. На основе ядерных и митохондриальных ДНК маркеров проведена апробация генетического паспорта РМС аральского усача *L. brachycephalus*

содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник». По четырем (*Barb37; Barb79; BC8; BC37*) микросателлитным локусам выявлено 14 аллелей, число аллелей на локус среднем значении составило 3,75). С помощью гена *COI* мтДНК была идентифицирована принадлежность ремонтно-маточного стада содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» с точностью совпадения нуклеотидной последовательности до 99,86 % к аральскому усачу.

Личный вклад автора. Автор диссертационной работы в полной мере внес свой вклад при выборе концепции исследования. Определения цели диссертации, постановка задач исследования, анализ литературных данных, планирование и выполнение методик, статистическая обработка результатов, обобщение и обработка полученных данных, оформление выполнено полностью автором диссертации. Кроме того, автор способствовал публикации всех научных работ: подготовка рукописи, построение графиков, анализ результатов, корреспонденция и ответы рецензентам.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена самим диссертантом и финансирована в рамках научно-технической программы BR10264236 «Научно-технологическое обеспечение комплексного развития аквакультуры Казахстана путем разработки и внедрения инновационных технологий и новых объектов рыбоводства» (2021-2023 гг.), где автор был ответственным исполнителем по разделу генотипирования усачей. Фундаментальная часть диссертации и основные молекулярно-генетические методы были выполнены в лаборатории молекулярной систематики, отделе биоразнообразия и эволюционной биологии в Национальном музее естественных наук (г. Мадрид, Испания) в период зарубежной стажировки докторанта.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на международных научных конференциях: Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биоразнообразия и биотехнологии» (Астрахань, РФ, 2021 г.); Международная научно-практическая конференция к 70-летию Алтайского филиала ТОО «НПЦ рыбного хозяйства» (Усть-Каменогорск, Казахстан, 2022 г.); Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі» (Алматы, Казахстан, 2023 г.); Международная научно-практическая конференция «Рыбохозяйственные научные исследования» (Балхаш, Казахстан, 2023 г.).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 9 печатных работах, в том числе 2 статьи в изданиях, входящих в первый (Q1) и во второй (Q2) квартили базы данных Web of Science и Scopus; 1 статья в журнале входящая в перечень КОКСНВО МНВО РК; 4 тезиса в материалах международных конференций и 2 методические рекомендации (Комитет рыбного хозяйства МЭиПР РК).

Структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, заключение, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 139 страницах компьютерного текста, с соблюдением необходимых стандартов, включает 13 таблиц, 25 рисунков. Список использованной литературы содержит 306 источников.