

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 575.17:597.2/.5

На правах рукописи

АДЫРБЕКОВА КАМИЛА БОЛАТҚЫЗЫ

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

8D05104 - Генетика

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Исбеков К.Б., д.б.н., профессор.

Зарубежный научный консультант:
Ignacio Doadrio., доктор, профессор.
Национальный музей естественных
наук (Испания).

Республика Казахстан
Алматы, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Краткая история и физико-географическая характеристика основных водоемов Арало-Сырдарьинского бассейна.....	12
1.2 Редкие и исчезающие виды рыб и вопросы их сохранения.....	15
1.2.1 Антропогенные и эколого-биологические факторы, влияющие на распространение рыб.....	17
1.3 Биogeография и эволюция рода <i>Luciobarbus</i> , Heckel 1843.....	17
1.3.1 Ареал распространения рода <i>Luciobarbus</i> , Heckel 1843 на территории Арало-Сырдарьинского бассейна.....	19
1.4 Экологическое состояние усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.....	20
1.4.1 Распространение усачей в ирригационных сетях рисоводческих хозяйств Кармакшинского района Кызылординской области.....	22
1.5 Биологические особенности усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.....	24
1.6 Полиплоидия у рыб и роль в видообразовании.....	26
1.7 Применение молекулярно-генетического анализа для изучения вопросов филогенетики рыб	27
1.7.1 Применение ядерных маркеров ДНК.....	28
1.7.2 Применение митохондриальных маркеров ДНК.....	30
1.7.3 Комплексный анализ ядерных и митохондриальных маркеров.....	30
1.8 Генетическая паспортизация ремонтно-маточного стада в аквакультуре.....	31
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	33
2.1 Материалы исследований.....	33
2.1.1 Отбор половозрелых особей для формирования ремонтно-маточного стада.....	36
2.1.2 Краткая характеристика рыбоводного хозяйства.....	36
2.1.3 Отбор проб для молекулярно-генетического анализа.....	37
2.2 Методы исследований.....	37
2.2.1 Картирование точек сбора материала.....	37
2.2.2 Проведение биологического и морфологического анализа.....	38
2.3 Исследования генетической структуры рыб.....	39
2.3.1 Выделение геномной ДНК.....	39
2.3.2 Оценка чистоты выделенной ДНК.....	40
2.3.3 Применения ядерных маркеров для оценки генетической	

	структуры.....	40
2.3.4	Полимеразная цепная реакция (ПЦР) ядерных маркеров.....	40
2.3.5	Электрофорез и секвенирование ядерных маркеров.....	41
2.4	Применение ядерных маркеров для генетической паспортизации.....	41
2.4.1	Подбор ПЦР программы для генетической паспортизации.....	41
2.5	Применение митохондриальных маркеров.....	42
2.5.1	Применение митохондриального маркера <i>Cytb</i> и подбор ПЦР программы.....	42
2.5.2	Электрофорез и секвенирование митохондриального маркера <i>Cytb</i>	42
2.5.3	Применение митохондриального маркера <i>COI</i> и подбор ПЦР программы.....	42
2.5.5	Электрофорез и секвенирование митохондриального маркера <i>COI</i>	43
2.6	Обработка статистических данных морфобиологического анализа.....	43
2.7	Обработка и анализ молекулярных данных ядерных маркеров.....	43
2.8	Обработка и анализ молекулярных данных митохондриальных маркеров.....	45
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	47
3.1	Биологическая и морфологическая характеристика усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.....	47
3.2	Статистический анализ сходства морфометрических признаков усачей.....	49
3.3	Результаты генетического анализа усачей	53
3.3.1	Результаты оценки чистоты выделенной ДНК.....	53
3.4	Результаты применения микросателлитных локусов для оценки генетического разнообразия.....	53
3.4.1	Оценка частоты нуль-аллелей и обнаружение мономорфных локусов.....	55
3.4.2	Оценка генетического разнообразия аллелей по микросателлитным локусам	56
3.4.3	Оценка генетической изменчивости усачей.....	58
3.4.4	Генетическая структура рода <i>Luciobarbus</i> Heckel, 1843 основанная на ядерных маркерах.....	59
3.4.5	Анализ частных аллелей для рода <i>Luciobarbus</i> Heckel, 1843 при идентификации по ядерным маркерам.....	62
3.4.6	Оценка естественной гибридизации среди особей.....	62
3.5	Результаты применения митохондриального гена <i>Cytb</i>	64
3.5.1	Внутрипопуляционное генетическое разнообразие аральского усача по результатам митохондриального гена <i>Cytb</i>	64
3.5.2	Филогенетический анализ рода <i>Luciobarbus</i> Heckel, 1843 с помощью митохондриального гена <i>Cytb</i>	68
3.6	Результаты применения митохондриального гена <i>COI</i>	72

3.7	Результаты применения микросателлитных локусов для генетической паспортизации усачей.....	73
3.7.1	Аллельное разнообразие аральского усача по отобранным локусам.....	74
3.7.2	Генетическая паспортизация ремонтно-маточного стада аральского усача <i>L. brachycephalus</i>	75
3.7.3	Необходимость генетического мониторинга при формировании ремонтно-маточного стада аральского усача в индустриальных условиях	77
3.8	Вопрос сохранения естественных популяций усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.....	79
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	84
	ПРИЛОЖЕНИЕ А - Фотографии исследованных точек сбора и изученных экземпляров усачей.....	105
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Синтезированные олигонуклеотиды и первичные данные ядерных маркеров.....	108
	ПРИЛОЖЕНИЕ В - Хроматограммы нуклеотидных последовательностей митохондриального маркера.....	114
	ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Полученные нуклеотидные последовательности усачей рода <i>Luciobarbus</i> Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна..	132
	ПРИЛОЖЕНИЕ Д - Акт внедрения результатов исследований и методическая рекомендация.....	138

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

STR-локусы (микросателлиты) - short tandem repeats представляют собой тандемные повторы ДНК размером от 2 до 6 нуклеотидов. Имеют высокие скорости мутирования, что приводит к накоплению популяционно-специфических мутаций и позволяет использовать информацию об изменчивости микросателлитных локусов для анализа структуры популяций.

Аллель - это разные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых локусах парных хромосом.

Автополиплоиды - это организмы, у которых один и тот же хромосомный набор x (геном) повторяется несколько раз. К автополиплоидам относятся триплоиды ($2n=3x$), тетраплоиды ($2n=4x$).

Аллополиплоид - гибридный организм, в клетках которого произошло объединение хромосомных наборов от разных видов и родов.

Викарирующий - систематически близкие, биологически сходны виды, замещающие друг друга географически и имеющие соприкасающиеся ареалы (географический викариат) или же встречающиеся в пределах одного ареала.

Гексаплоид - организм, содержащий шестикратный набор хромосом

Ген - участок молекулы ДНК то есть единица генетического материала, неделимая в функциональном отношении.

Генетический автостоп - это процесс, при котором изменение частоты одного гена в популяции происходит вместе с изменением частоты смежных генов, которые находятся на том же хромосомном участке.

Генетический дрейф - случайные изменения частот аллелей и генотипов, происходящие в небольшой полиморфной популяции при смене поколений.

Генотип – совокупность аллелей гена или группы генов, контролирующих какой-либо признак.

Интрогрессия – длительный процесс, перенос генетического материала от одного вида в генофонд другого путем повторного обратного скрещивания межвидового гибрида с одним из его родительских видов.

мтДНК - митохондриальная ДНК, находящаяся в митохондриях, органоидах эукариотических клеток.

Полиморфизм – разнообразие популяций по признакам или маркерам генетической природы.

Симпатрия - зона перекрывания ареалов двух видов или форм, то есть способность двух видов или форм сосуществовать на одной территории.

Эволюционный консерватизм – территориальное постоянство преобладает над подвижностью.

Эффективный размер популяции - среднее количество особей в популяции, генный вклад которых обеспечивает её выживание и успешное размножение.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

STR	short tandem repeat (анализ коротких tandemных повторов)
mtDNA	(мтДНК) митохондриальная ДНК
<i>COI</i>	фрагмент мтДНК цитохром-с-оксидазы
<i>Cytb</i>	цитохром b
ПЦР	полимеразная цепная реакция
F	(forward) прямой
R	(reverse) обратный
п.н.	пар нуклеотидов
мкл	микролитр
об/мин.	оборотов в минуту
ddH ₂ O	стерильная вода без нуклеаз
n	количество исследованных экземпляров
min	минимальное значение показателя
max	максимальное значение показателя
M	среднее значение показателя
m	среднеквадратическое отклонение
CV	коэффициент вариации
PCoA	(principal coordinate analysis) анализ главных координат
экз.	экземпляров
РМС	ремонтно-маточное стадо
МСОП	Международный союз охраны природы
р.	река
вдхр.	водохранилище
г.	город
с.	село
et al.	и другие

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационного исследования. 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 Сырдарья. Огромное негативное влияние на размножение популяции усачей оказало зарегулирование стока рек Сырдарья и Амударья, впоследствии это привело к серьезному нарушению естественного воспроизводства и катастрофического сокращения 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 с помощью ядерных и митохондриальных маркеров. К тому же, вопросы выяснения видовой принадлежности туркестанского усача *L. conocephalus* остается до сих пор не изученным.

Установлено, что на территории Республики Казахстан вовсе исчезли эндемики сырдарьинский лжелопатонос *Pseudoscaphyrinchus fedtschenkoi* и щуковидный жерех *Aspioluceus esocinus* (Красная Книга РК, 2008). Вероятно, в будущем популяция усачей будет поддерживаться в основном за счет искусственного воспроизводства. Следовательно, в настоящее время единственный и решающий способ восстановить численность усачей является искусственное воспроизводство с учетом оценки генетического разнообразия. До настоящего времени специализированных генетических исследований по ценным, редким и эндемичным видам рыб не проводилось, а именно генетическая паспортизация для направленного формирования ремонтно-маточного стада усачей. Все вышесказанное определяет актуальность выбранного исследования.

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. В соответствии с целью работы были сформулированы следующие задачи:

1. Провести картирование мест обитания усачей в Арало-Сырдарьинском бассейне. Изучить биологические и морфологические характеристики усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.
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 внутривидовое 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 митохондриальных ДНК маркеров.

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

Научная новизна исследования. Выборки, используемые в работе, покрывают значительную часть современного ареала двух видов.

Впервые обширно и углубленно было оценено генетическое разнообразие рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 из Арало-Сырдарьинского бассейна на основе 15 из 17 информативных микросателлитных локусов ДНК.

Впервые изучена генетическая структура рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 из Арало-Сырдарьинского бассейна основанная на ядерных маркерах. Обнаружены частные аллели для рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 позволяющие идентифицировать изученные виды.

Впервые определена нуклеотидная последовательность мтДНК-маркера *Cytb* усачей Арало-Сырдарьинского бассейна.

Впервые изучено внутривидовое генетическое разнообразие и построена сеть гаплотипов для аральского усача по результатам гена *Cytb* митохондриальной ДНК.

Впервые проведен филогенетический анализ рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 на основе гена *Cytb* митохондриальной ДНК и 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 из 10 микросателлитных локусов и гена *COI* митохондриальной ДНК.

Впервые по результатам исследований даются методические рекомендации по сохранению популяционных генофондов вида, обоснованные с позиций природоохранной генетики.

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. 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. Несмотря на сокращение биоразнообразия нативной ихтиофауны, до настоящего времени специализированных генетических исследований по ценным, редким и эндемичным видам рыб не проводилось, а именно генетическая паспортизация. 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. Результаты данных исследований могут быть использованы природоохранными, рыбохозяйственными, и другими организациями, деятельность которых направлена на охрану, воспроизводство и рациональное использование рыбных ресурсов. Разноплановые комплексные молекулярно-генетические исследования необходимы для сохранения генофонда и развития аквакультуры. Эти методы эффективны, перспективны в аквакультуре 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 распространения туркестанского усача, так как ранее в исследованных точках отлова встречались лишь представители аральского усача. Результаты морфо-биологического анализа демонстрируют, что усачи двух видов близки друг к другу по совокупности морфо-биологических признаков, большинство из которых перекрываются, в этой связи для детального анализа видовой принадлежности существует необходимость проведения дополнительных молекулярных подходов.

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.

3. Изучена генетическая структура, основанная на ядерных маркерах для представителей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 которые эффективно разграничили виды усачей, также они могут быть полезны для внутривидовой 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 внутривидовой генетической структуры аральского усача принадлежащих к единому бассейну Арал-Сырдарья, при подсчете индексов гаплотипного разнообразия, всего выявилось 19 гаплотипов по результатам гена *Cytb* митохондриальной ДНК. Филогенетический анализ по Байесу и методу максимального правдоподобия для гена *Cytb* подтвердил наличие четырех 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* на основе 4 из 10 ядерных маркеров и гена *COI* митохондриальной ДНК. Выявлена принадлежность исследуемых образцов с точностью совпадения нуклеотидной последовательности до 99,86 %, данный результат подтверждает принадлежность сформированного ремонтно-маточного стада усача содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» к виду аральский усач. Микросателлитные локусы рекомендованы *Barb37*, *Barb79*, *BC8*, *BC37* рекомендованы для генетической паспортизации производителей аральского усача.

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. Прикладная часть диссертации была выполнена в лаборатории генетики гидробионтов ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства». 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 и основные положения диссертации 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 "Научно-производственный центр рыбного хозяйства" Развитие рыбной отрасли: Актуальные проблемы и пути их решений (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: опыт, проблемы и перспективы», посвящённый 90-летию Балхашского филиала ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства» (Балхаш, Казахстан, 2023 г.);

-Были внедрены результаты научных работ в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» и получен акт внедрения по проведению генетической паспортизации ремонтно-маточного стада аральского усача *L. brachycephalus*.

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 Scopus и Web of Sciences; 1 статья в журнале входящая в перечень КОКСНВО МНВО РК; 4 тезиса в материалах международных конференций и 2 методические рекомендации (Комитет рыбного хозяйства Министерства экологии и природных ресурсов Республики Казахстан), одна из которых на тему: «Рекомендации по подбору микросателлитных локусов для генетической паспортизации ремонтно-маточного стада аральского усача (*Luciobarbus brachycephalus*).

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Краткая история и физико-географическая характеристика основных водоемов Арало-Сырдарьинского бассейна

Когда-то Аральское море было четвертым по площади внутренним водоемом в мире [1]. Аральское море как уникальный внутриматериковый водоем образовалось в одноименной котловине. По имеющимся сведениям Аральская котловина образовалась 21,12 млн. лет назад в середине Кайназойской эры [2]. Первичной водой, заполнившей Аральскую котловину, была вода Мирового океана. Общая площадь котловины 350 тыс. км². По мнению ряда авторов, Каспийское и Аральское моря, имеют остаточные происхождения от прежних водоемов, которые были когда-то соединены с Мировым океаном. Каспийское и Аральское озеро-море в Хвалынский период были соединены проливом с Азовским морем по долине Маныча [3]. В последующие эпохи они были отчленены от Мирового океана и какое-то время существовали как единый внутриматериковый бассейн [2]. Соединение Аральского и Каспийского морей предположительно было в конце плейстоцена — начале голоцена [4;5]. Отмечались палеогеновые и неогеновые отложения, отложившиеся в бассейне реки, которые были сложены глиной и кварцем [6].

После потери связи с Мировым океаном, затем с Каспием, Аральское море как внутриматериковый бессточный бассейн стало зависимым от стоков двух крупнейших среднеазиатских рек – Амударьи и Сырдарьи [7]. Постепенно вода Аральского моря стала преснее, чем обычная морская вода и водились в нем преимущественно пресноводные виды рыб. Из двух рек, питавших Арал, с момента впадения в него постоянно действовала река Сырдарья. По имеющимся сведениям, река Сырдарья образовалась в конце третичного и начале четвертичного периодов [2].

Отмеченные особенности географического положения, полная изоляция от Мирового океана делают Арал уникальным водоемом, который относится к типу «озеро-море». Аральское море окружено со всех сторон сушей и расположено в зоне пустынь Средней Азии и лежит на 48,5 м выше уровня океана. Море удалено на 2500 км от Северного Ледовитого, на 4300 км от Атлантического на 18 000 км от Тихого и на 1800 км от Индийского океанов, открыто с запада, севера и востока, а с юга защищено высочайшими горными системами.

Одна из физико-географических особенностей замкнутого Аральского моря — постепенное изменение его морфометрических характеристик, связанное с непостоянством объема воды в нем соответственно различным высотным положением уровня и разными размерами площади водной поверхности моря.

Арал разделился на два водоема – Большое и Малое море (Северное Аральское море) в 1988-1989 гг. Эти два «плеса», то есть участок реки от одного изгиба до другого, существовали и раньше, при едином Арале их соединял знаменитый пролив Берга.

Четко выраженной периодичностью характеризуются сезонные колебания уровня воды. Максимальный подъем уровня летом обычно является результатом распространения паводковой волны стока Амударьи и Сырдарьи. Осеннее понижение обусловлено испарением с водной поверхности, которое достигает наибольших величин после прохождения речного паводка. Зимний минимум высоты стояния уровня связан с очень малым количеством воды, приносимой реками в море.

Хотя Аральское море лежит в южной зоне, на нем ежегодно образуется лед. Примерно во второй декаде ноября обычно начинается льдообразование в прибрежных районах на севере и северо-востоке моря. В конце этого месяца первичные формы льда появляются у южных берегов. В открытом море лед наблюдается со второй декады декабря, а у западного побережья льды образуются обычно в первой декаде января. В середине февраля ледяной покров достигает наибольшего развития [8].

Гидрохимические особенности Аральского моря проявляются не только в отмеченном своеобразии солевого состава его воды, но и в содержании и распределении растворенных в ней кислорода и основных биогенных веществ. В водах Аральского моря в течение круглого года содержится большое количество растворенного кислорода с пересыщением в глубоких слоях иногда до 150—200%. Это объясняется развитой фотосинтетической деятельностью высшей подводной растительности вследствие малых глубин и высокой прозрачности аральской воды, небольшим потреблением кислорода сравнительно малочисленным планктоном и небольшим содержанием легко окисляющихся органических веществ, поступающих в море с речным стоком.

По мере усыхания озеро Арал на протяжении второй половины XX в. превращалось из солоноватого водоема в соленый; теперь Малый Арал остается солоноватым, несмотря на то, что остаточные водоемы на месте Большого Арала являются гиперсолеными. Вместе с тем, почти три последних десятилетия речной сток в Арал неуклонно убывает и соответственно непоколебимо понижается уровень моря. С сокращением объема воды льдообразование на севере и востоке начинается несколько раньше средних многолетних сроков, уменьшается летний теплозапас, понижается температура замерзания, охлаждение моря протекает усиленно. В море с речными водами стало поступать меньше биогенных веществ. Все эти факторы привели к сокращению биологической продуктивности Арала, к примеру, обсохли многие нерестилища и места нагула рыбы. Обмеление моря продолжается и не исключено в будущем. В этом случае очертания и природа моря будут существенно регрессировать. Согласно результатам расчетных контур моря при различных положениях уровня в близкие и дальнейшие годы показывают, что в финальной перспективе Аральское море может размельчиться на несколько отдельных бассейнов и перестать существовать как единый самостоятельный водоем [9].

На нынешнем этапе Аральское море было признано глобальным экологическим бедствием, так как уровень воды резко убавился. Снижение

уровня воды усиливает соленость воды, воздействуя на ландшафт и биоразнообразие. Открытое дно озера становится источником мелкодисперсной пыли, поднимаемой пыльными бурями и распространяющейся на длительные расстояния [10].

Исторически Аральское море и его бассейн имеют хорошую изученность. Значительный вклад в методические вопросы изучения Аральского моря внесли труды В.В. Бартольда [11] и Л.С. Берга [12].

Берг Л.С. в 1908 году опубликовал монографию «Аральское море. Опыт физико - географической монографии». Он опроверг гипотезу об усыхании моря, показав, что были только колебания уровня воды в связи с временными климатическими изменениями. Л.С. Берг считал, что к исчезновению водоема может привести чрезмерное использование вод Сырдарьи и Амударьи для нужд орошения среднеазиатских почв. Современное представление об Аральском море и существующих проблемах в связи с его усыханием изложено во многих работах [13- 21].

В связи с полным исчерпанием ресурсов и резким ухудшением экологической обстановки период интенсивного развития орошения в бассейне Аральского моря закончился [15].

Изъятие огромных объемов воды из Сырдарьи и Амударьи и, соответственно, доли их стока, питавшего Аральское море, продолжало расти. Стало очевидным необходимость применения дренажа и промывного режима орошения. Однако промывной режим орошения на фоне дренажа не привел к ожидаемому положительному эффекту: площадь засоленных почв на орошаемых землях увеличилась и достигла 50% от площади орошаемых земель. Ускорил процесс снижения уровня воды в Аральском море резко возросший забор воды из Сырдарьи и Амударьи на промывку засоленных земель [22]. В результате сброса в реки коллекторно-дренажных вод увеличилось ее загрязнение ядохимикатами, а также резко возросла минерализация речной воды, к примеру, в низовьях рек минерализация достигла 2-3 г/л [23]. Как отмечает Всемирный банк, засоление орошаемых земель в бассейне Аральского моря представляет угрозу «фундаментального и сложного характера» для всех аспектов безопасности (водной, экологической, социальной, продовольственной и т.д.) стран данного региона [16].

Сокращение огромной водной поверхности и падение уровня Аральского моря, обуславливая трансформацию природной среды Приаралья, также сопровождаются климатическими изменениями. Эта тенденция оказывающее заметное влияние на водные ресурсы Центральной Азии характеризуется как аридное потепление [19].

В течение последних 100 лет произошли колоссальные изменения в Аральском море и бассейне реки Сырдарья. С учетом климатических изменений и антропогенного влияния, изменились практически все характеристики этих объектов [24].

Истоки р. Сырдарья находятся в Центральном (Внутреннем) Тянь-Шане. Основной сток р. Сырдарья формируется на территории Кыргызстана. Затем р.

Сырдарья пересекает Узбекистан и Таджикистан и впадает в Аральское море на территории Казахстана. По своей протяженности Сырдарья является наиболее крупной рекой Средней Азии, по водоносности она уступает только Амударье. Самое крупное водохранилище – Шардаринское на р. Сырдарья. Многолетние наблюдения за стоком рек показывают, что маловодные годы чередуются с многоводными, причем, маловодные годы чаще бывают по 2-3 раза подряд, многоводные, чаще по одному. В различные годы по оценке уровня водности, поверхностный сток рек подвержен значительным колебаниям [25].

Бассейн реки Сырдарья – который впадает в Аральское море является вторым по водоносности речным бассейном в Центральной Азии. В горной части формируется основная часть стока р. Сырдарья. Условно основное течение р. Сырдарья можно разделить на три части: верхнее течение в Кыргызстане, где образуется большая часть водного стока; среднее течение в Узбекистане и Таджикистане, а также нижнее течение в Казахстане, до впадения в Аральское море. Наиболее крупными притоками Сырдарьи на территории Казахстана являются реки Арыс, Келес, Бадам, Бугунь, Боролдай, а также мелкие реки, вытекающие с юго-западных склонов хребта Каратау [24].

Арало-Сырдарьинский бассейн занимает площадь около 345 тыс. км². Нижнее течение реки Сырдарья является основной рекой бассейна [25]. В пределах Казахстана протяженность реки от Шардаринского водохранилища до Аральского моря составляет 1627 км, из них на территории Кызылординской 1281 км, Туркестанской области-346 км.

1.2 Редкие и исчезающие виды рыб и вопросы их сохранения

Рыбы являются одними из самых исчезающих видов из-за большого хозяйственного значения для человечества, они являются объектом промысла, и в большинстве случаев подвергаются чрезмерному вылову. Рыбы — самая богатая видами группа позвоночных, в настоящее время известно 36 105 видов [26].

Существуют разные причины опасности: рыболовство, деградация среды обитания, загрязнение водоема, чужеродные виды, изменения климата, но обычно угроза возникает благодаря синергии различных факторов. Многочисленные воздействия и нагрузка на окружающую среду приводят к истощению биоразнообразия и здесь необходимо предпринять меры по сохранению биоразнообразия [27].

Работы по выявлению редких и исчезающих рыб были начаты американскими исследователями в начале 60-х годов, американское общество герпетологов и ихтиологов создало Комиссию по охране холоднокровных животных, которой было поручено заняться изучением состояния редких и исчезающих видов в США. Эта комиссия пришла к выводу, что к тому времени, по крайней мере, 14 видов североамериканских пресноводных рыб исчезли [28].

Таким образом, в 1964 году при Международном союзе охраны природы и природных ресурсов (МСОП) был создан специальный комитет, в задачи

которого входило изучить состояние пресноводных (и частично проходных) рыб во всем мире. Из 10 336 пресноводных рыб, статус сохранения которых был оценен МСОП, 10 видов рыб вымерли в дикой природе по состоянию на 2021 год. Считается, что почти 30 процентов пресноводных видов находятся под угрозой исчезновения [29].

Красная книга Казахстана является важным инструментом для сохранения и управления биоразнообразием в стране. Она предоставляет собой информацию о статусе видов и служит основой для разработки стратегий и планов по сохранению биоразнообразия. На данный момент, по имеющимся литературным данным 18 видов круглоротых и рыб занесены в Красную книгу Казахстана [30,31]. Установлено, что на территории Республики Казахстан вовсе исчезли сырдарьинский лжелопатонос *Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi*, щуковидный жерех (лысач) *Aspioluceus esocinus* и остролучка *Capoetobrama kuschakewitschii* [32].

В последние годы одной из важнейших глобальных проблем, стоящих перед человечеством, стало сохранение биологического разнообразия Земли. Несомненно, что наиболее уязвимым компонентом биоразнообразия, самым чутким интегрированным индикатором его неблагоприятных изменений являются редкие виды животных и растений [33-36].

Одним из основных способов сохранения ценных видов рыб сейчас признаётся искусственное воспроизводство [37-39].

Во всем мире в настоящее время предпринимаются попытки увеличения численности редких и исчезающих видов рыб, обсуждаются методы и принципы их охраны [40-48].

Сохранить отдельно взятый вид или его популяцию невозможно без охраны всей экосистемы в целом. Поэтому одна из первых и самых важных мер спасения редких и исчезающих видов – это сохранение уникальных водных экосистем путем создания заповедников, заказников и национальных парков. В некоторых случаях заповедными могут быть места размножения редких и исчезающих видов, которые послужат своеобразным рефугиумом то есть неким речным убежищем [49,50].

В настоящее время представляется чрезвычайно актуальным создание в Казахстане специализированных, хорошо оборудованных центров по содержанию (рекреации) редких и исчезающих представителей ихтиофауны, где сохранялся бы их генофонд и отработывались бы методические вопросы искусственного разведения. Современным подходом в сохранении исчезающих видов является криоконсервация их генома, или создание низкотемпературных генетических банков, где сперма, икра, гонады и соматические клетки могут храниться в течение длительного времени.

Проблема сохранения особо ценных видов животных не только как единица биоразнообразия, объектов промышленного и любительского лова, но и как носителей генетической информации является особенно актуальной.

Становится очевидным, что в большинстве случаев нельзя ограничиться охраной только определенных видов рыб и их мест обитания, необходимо

сохранение экосистем в целом, а также перестройка всех механизмов управления рыболовством и охраны рыб [51]. При этом пренебрежение биологическими особенностями объектов охраны часто приводит к тому, что все усилия оказываются бесполезными, а иногда даже вредными. Особое внимание необходимо уделять истории становления отдельных видов рыб и их естественных сообществ [52].

1.2.2 Антропогенные и эколого-биологические факторы, влияющие на распространение рыб

Резкое снижение численности многих видов рыб особенно усилилось во второй половине XX века и в большинстве вызвано комплексным воздействием антропогенных и эколого-биологических факторов [50]. Антропогенные, такие как зарегулирование водного стока, загрязнение водоёмов, любительский лов, промысел, браконьерство и другие.

Преимущественно, для Арало-Сырдарьинского бассейна это строительство плотин и зарегулирование стока на реке Сырдарья. К примеру, плотина Кокарал, строительство которой началось в 2005 году, длиной 13 километров, для сохранения уровня Малого Арала на абсолютной отметке 42 м. В настоящее время плотина не оборудована рыбоходом, как и другие, например Басыкара, что сокращает возможности нерестующим рыбам подниматься в море.

Попадание несметного количества биогенных элементов (отходы, животноводства, канализационные стоки, удобрения) увеличивает эвтрофикацию водоемов, приводит к зарастанию, вызывая цветение воды, заиливанию дна и часто происходят массовые заморы рыбы. В результате этого во многих водоемах происходит изменения возраста полового созревания, периодичности нереста и полная смена ихтиофауны: длинноциклические, более ценные рыбы замещаются на короткоциклические, менее ценные [50,53].

В основном негативное влияние на ихтиофауну водоемов Казахстана носит комплексный, многофакторный характер (проблемы трансграничных рек, загрязнение водоемов, гидростроительство, повышенная рекреационная нагрузка, отсутствие рыбозащитных устройств, браконьерство) [54-57]. С учетом вышесказанных имеющихся проблем, необходимость формирования ремонтно - маточных стад ценных видов рыб совершенно очевидна.

1.3 Биogeография и эволюция рода *Luciobarbus*, Heckel 1843

Среди пресноводных рыб семейство карповых (*Cyprinidae*) включает 285 родов [58] и около 3200 видов [59].

С таксономической точки зрения на протяжении времени разные авторы рассматривали это семейство как сложное, исходя из этого, *Cyprinidae* было разделено на различные подсемейства. Так Чен и другие [60], которые выделили 10 подсемейств, к 7 предложенным подсемействам. Хоус [61], разделил на *Cyprininae*, *Gobioninae*, *Acheliognathinae*, *Leuciscinae*, *Cultrinae*, *Alburninae* и *Rasborinae*. Позже Кавендер и Коберн [62], предложили разделить

семью на две основные линии, карповые и лейцисциновые; затем Нельсон [63], недавно признал 12 подсемейств, между которыми можно выделить подсемейства *Cyprininae* и *Barbinae*.

Нельсон [63], считает, что в подсемействе *Cyprininae* включает следующие роды: *Aptosyax*, *Anematichthys*, *Aulopyge*, *Barbus*, *Capoeta*, *Carassius*, *Catlocarpio*, *Cyclocheilichthys*, *Cyprinion*, *Cyprinus*, *Gymnocypris*, *Luciobarbus*, *Luciocyprinus*, *Poropuntius*, *Rohtee* и *Varicorhinus*.

Для подсемейства *Barbinae* он рассматривает следующие роды: *Acrossocheilus*, *Balantiocheilos*, *Barbus*, *Clypeobarbus*, *Diptychus*, *Haludaria*, *Hampala*, *Onchystoma*, *Oreochthys*, *Pseudobarbus*, *Puntius*, *Schizothorax*, *Sinocyclocheilus*, *Semiplotus*, *Spinibarbus* и *Tor*. Эта классификация рассматривает роды *Luciobarbus* и *Barbus* как принадлежащие к разным подсемействам.

Впрочем, классификация подсемейства *Cyprininae* обсуждалась многократно [64-71].

Род *Luciobarbus* Heckel, 1843 включает рыб среднего и крупного размера, широко распространенных в реках, впадающих в Персидский залив, Эфиопии, Северной Африки, Средиземного, Черного, Каспийского и Аральского моря [72-74]. Как и многие другие карповые, данный род долгое время входил в состав рода *Barbus* Cuvier, 1816. Первоначально род *Luciobarbus* Heckel 1843 считался младшим синонимом рода *Barbus* [75]. Последующие морфологические и молекулярные исследования привели к признанию родового уровня [73; 76-80]. *Barbus sensu stricto* и *Luciobarbus* четко отличаются по пластическим признакам костей черепа [81], морфологией глоточной кости [82] и размещенных глоточных зубов [83]. Это стало основанием для дальнейшего повышения статуса *Luciobarbus* до уровня самостоятельного рода [82]. Окончательное разделение усачей на две эволюционные линии произошло около $8,1 \pm 0,4$ млн. л.н. [84].

Древнейшие останки представителей рода найдены в отложениях среднего миоцена Турции [85;86]. На данный момент описаны 5 вымерших видов рода: *Luciobarbus subtruncatus* (Münster, 1842), *Luciobarbus vindobonensis* (Böhme, 2002), *Luciobarbus xanthopterus* (Heckel, 1843), *Luciobarbus* sp. 1 и *Luciobarbus* sp. 2, род насчитывает 42 записи в базе данных fosFARbase [87], найденных в таких странах как Австрия, Греция, Италия, Ливия, Румыния, Словакия, Испания, Турция и Украина.

По летописи окаменелостей можно отследить рассеивание во время эоцена-олигоцена. Самая старая известная окаменелость карповых - *Parabarbus* sp. из раннего эоцена (49,0–54,8 млн. лет назад) в отложениях обайлинской свиты Зайсанской котловины в Казахстане [88;89]. В то время в Европе (Чешской Республике) отмечено присутствие первых карповых по окаменелостям, которые были датированы 33-34 млн. лет назад, в раннем олигоцене [90;91].

Основываясь на этих выводах, классическое биогеографическое объяснение, впервые сформулированное [92] и это было названо теорией

расселения на север [93]. Эта теория предполагает, что нынешнее распространение пресноводных рыб в Европе произошло в результате расселения через Восточную Азию в Сибирь в сторону Центральной Европы и стран Средиземноморья [92;94]. Теория северного расселения подтверждается не только летописью окаменелостей, но и историческим распространением других позвоночных, а также палеогеография региона. Таким образом, закрытие Тургайского пролива в конце эоцена, несомненно, оказало огромное влияние на распространение биоты и многих наземных организмов [95;96].

Лундберг Дж. [97] считает, что нынешнее географическое распределение карповых определяется совокупностью исторических изменений, связанных с геологической эволюцией региона, поскольку они являются преимущественно пресноводными рыбами с низкой способностью к расселению и непереносимостью солености [98].

Внутри рода *Luciobarbus* с течением времени были выделены две линии, одна из которых включает виды *Luciobarbus* с Пиренейского полуострова, а вторая состоит из остальных видов этого рода, в который входят североафриканские виды и восточные виды [75;79;80;82]. Текущие систематические знания об этом роде основаны на нескольких ревизиях с использованием морфологических, остеологических и молекулярных подходов, при этом к настоящему времени описано более 35 видов [99-102].

1.3.1 Ареал распространения рода *Luciobarbus*, Heckel 1843 на территории Арало-Сырдарьинского бассейна

В водоемах, на территории Казахстана встречается два вида усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843: аральский усач *Luciobarbus brachycephalus* Kessler, 1872 и усач булат-маи *Luciobarbus capito* Güldenstädt, 1773, которые относятся к понтокаспийскому пресноводному фаунистическому комплексу и имеют в значительной мере совпадающие ареалы [30;103;104]. Аральский усач *L.brachycephalus* представлен двумя подвидами: каспийским *L.brachycephalus caspius* Berg в бассейне Каспия и номинативным в бассейне Арала *L.brachycephalus brachycephalus* Kessler. Усач булат-маи *L. capito* также представлен двумя подвидами: в южной части Каспия, не встречаясь в казахстанской, и в бассейне Аральского моря как туркестанский усач *L.capito conocephalus* Kessler [103]. В настоящее время в международных базах данных [58;104;105] таксономии рыб не рассматриваются подвиды рыб, в том числе и усачей *L. brachycephalus brachycephalus*; *L. brachycephalus caspius*; *L.capito conocephalus*. Следовательно, необходимо уточнение актуальной информации в таксономии данного рода.

На карте отмечено условное расселение усачей в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна (рисунок 1).

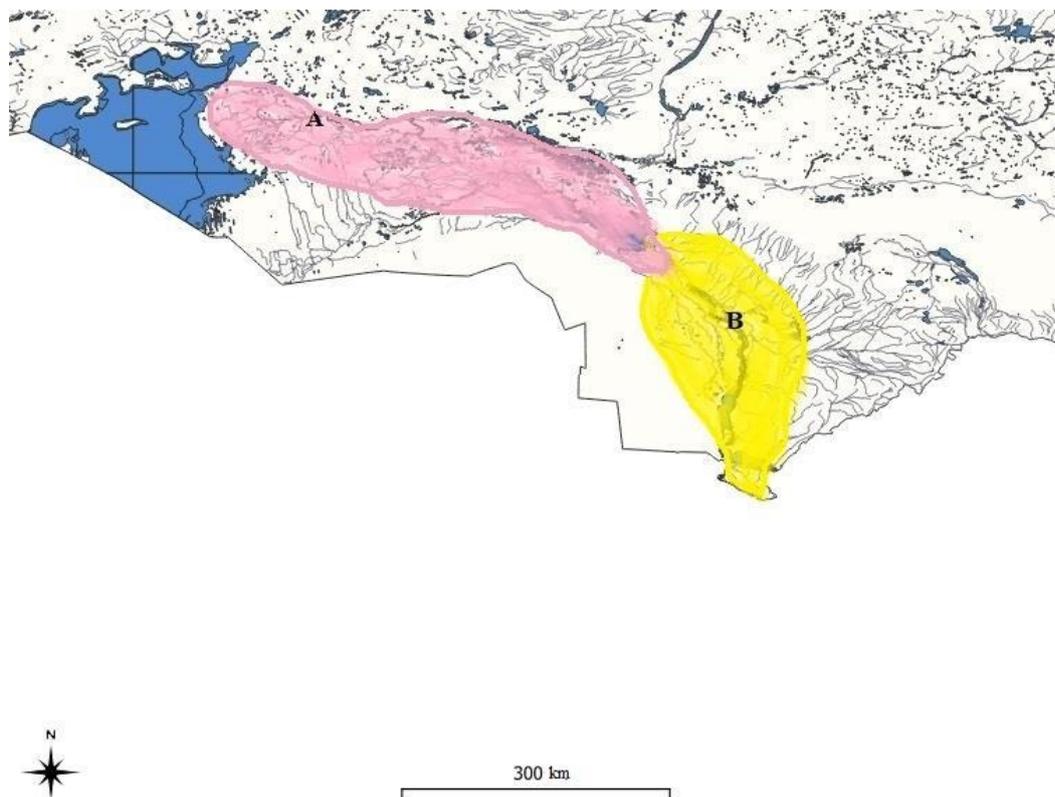


Рисунок 1 - Распространение аральского усача *Luciobarbus brachycephalus* Kessler, 1872 (A) и туркестанского усача *Luciobarbus conocephalus* Kessler, 1872. (B).

1.4 Экологическое состояние усачей Арало-Сырдарьинского бассейна

В прошлом усачи - ценные промысловые виды Аральского моря и реки Сырдарьи, но сегодня занесены в Красную Книгу Казахстана. В связи с этим, исследования современного их состояния крайне ограничены, так как требуется специальное биологическое разрешение.

Огромное негативное влияние на размножение популяции усачей оказало зарегулирование стока рек Сырдарьи и Амударьи, впоследствии это привело к серьезному нарушению естественного воспроизводства и катастрофического сокращения численности. По данным Эсмаили Х.Р., [106] популяция *L. brachycephalus* сократилась на 30% за последние 30 лет и продолжает снижаться из-за пересушивания вследствие повышения солености Аральского моря и запруживания его притоков. Поэтому эти виды были занесены МСОП (IUCN) в IUCN Red list, где имеют охранный статус *Vulnerable* (уязвимые). Усачи включены также в Красную книгу РК [30], где одним из предложений по исследованию является уточнение систематического положения в роде *Luciobarbus* Heckel, 1843. По литературным данным, вопрос об уточнении систематики рода до сих пор также является актуальным [103] и требует проведения молекулярно-генетического анализа.

Усачи морфологически очень близки и различаются лишь по небольшому числу признаков. При совпадении ареалов основой их разделения служат экология обитания и образ жизни (проходная и жилые формы).

Систематическое положение, таксономический ранг и родственные Арало-Сырдарьинской популяции в нескольких работах этой группы проводили исключительно сравнительно-морфологическим методом; при этом результаты исследований разных авторов зачастую существенно различаются [107; 108-111].

Колоссальное негативное влияние на размножение аральской популяции усачей оказало зарегулирование стока рек Сырдарья и Амударья, повлекшее за собой падение уровня моря, гибель молоди в ирригационных системах, резорбцию половых продуктов рыб в связи с большим отбором воды на орошение. Все вышеперечисленное привело к катастрофическому сокращению численности усачей и серьезному нарушению естественного воспроизводства. Плотины без рыбоходов преградили усачу пути к традиционным нерестилищам [112].

Естественный ареал аральского усача бассейн Арала, где наряду с типичной проходной формой обитает туводная, то есть постоянно живущая в реке. В море усач встречался повсеместно, особенно в прибрежье, встречался в Сырдарье как в самой реке и ее притоках, так и в Шардаринском вдхр. [103]. Также нужно отметить, что в 1930-1931 годах аральский усач из низовьев Сырдарьи был вселен в реку Иле (бассейн Балхаша) в районе нынешнего города Конаев, затем было выпущено более 18 тысяч сеголетков и двухлетков. В первые годы после вселения усач изредка встречался в уловах, но затем до 1949 года вовсе не был обнаружен, что позволило предположить неудачу акклиматизации. В дальнейшем на различных участках вновь стал попадаться разновозрастной усач [113-116]. В низовье реки Иле в начале 1980-х годов нерестовое стадо насчитывало около 3 тысяч экземпляров [116]. В реке Иле выше вдхр. Капшагай в 1991-1993 гг. подрост усач не отмечался, а его ранняя молодь в пробах была единична [117].

Туркестанский усач населяет водоемы бассейна Арала, но в отличие от аральского усача, является типично жилой, пресноводной формой, не совершающих миграций на далекие расстояния. В Аральском море встречался преимущественно в прибрежных опресненных участках и был вовсе редок [103]. Туркестанский усач живет небольшими группами или одиночно и образует скопления лишь в нерестовый период. Был отмечен в равнинных участках рек Сырдарья и Чу, сбросных и магистральных каналах ирригационных систем, а также в пойменных озерах [118;119]. Казахстанская часть ареала включает бассейн Сырдарьи от Шардаринского вдхр. до низовьев, в том числе бассейны рек, стекающих с юго-западных склонов хребта Каратау (Арыс, Боген) [103]. В отчетах экспедиций в реке Арыс, также были отмечены наличие двух этих видов.

До зарегулирования стока реки Сырдарьи основными факторами, влиявшими на изменение численности аральского усача, были величина и характер стока рек, от чего в значительной степени зависели условия захода в реку производителей и ската молоди в море [120]. Гидромелиоративное строительство на реках бассейна, повлекшее за собой расчленение рек на

участки, сокращение их стока и падение уровня, снижение скорости течения, уменьшение мутности привело к серьезному нарушению естественного воспроизводства усача. Огромное количество молоди усача погибло в ирригационных системах, поскольку скат совпадал по времени с наибольшими отборами воды из рек на орошение полей. Перекрытие Сырдарьи Казалинской плотиной окончательно подорвало естественное размножение проходного аральского усача [121-129].

Согласно архивным материалам, добывался усач в Аральском море круглый год, но в основном (около 90% всего вылова) в период массовой нерестовой миграции к дельтам рек. Концентрация его на сравнительно небольших участках и на довольно длительный срок (до 3 месяцев) создавала благоприятные возможности для промысла.

Средние уловы усача в Арале по десятилетиям составляют:

-1930-1939 гг. – 1140 тонн;

-1940-1949 гг. – 812 тонн;

-1950-1959 гг. – 870 тонн;

-1960-1969 гг. – 870 тонн;

-1970-1979 гг. – 326 тонн.

Уже в середине 1960-х годов в связи с зарегулированием стока реки Сырдарьи возникла проблема сохранения запасов аральского усача. Более того катастрофическое падение уровня Аральского моря и вызванное этим повышенная минерализация привели к тому, что к началу 1980-х годов аральский и туркестанский усачи перестали обитать в самом море [130].

1.4.1 Распространение усачей в ирригационных сетях рисоводческих хозяйств Кармакшинского района Кызылординской области

Ниже приведен обзор, начиная с 2000 годов, с учетом особенностей биологии и экологии, так в 2003 г. в ирригационной сети рисоводческих хозяйств Кармакшинского района Кызылординской области было отловлено и промерено более 300 экземпляров молоди усачей, преимущественно сеголеток, размером 4-16 см и массой 3-45 г [131]. Эта молодежь затем была выпущена в пруды Аманоткельского рыбхоза для формирования маточного стада. Тогда же биоморфологическому анализу были подвергнуты 43 особи, из которых 25 были отнесены к подвиду аральский усач и 18 к подвиду туркестанский [130].

В то же время в бассейне Сырдарьи есть места, где они имеют значительную численность. Это, прежде всего ирригационные системы рисоводческих хозяйств Кызылординской области. В мае - июле, усач широко распространяется по каналам, когда вода поступает в ирригационную сеть в изобилии. Годовики и более старшие возрастные группы, в большом количестве заходят в мелкие водоводы и на рисовые поля, покидая магистральный канал. Вместе с тем, в оросительные каналы и на поля пассивно выносятся пелагическая икра и личинка этих видов. В августе - сентябре, расход воды сокращается, стремясь выйти из ирригационных систем в Сырдарью, усачи поднимаются вверх по каналам [130]. Однако наличие на

каналах гидротехнических сооружений препятствует свободному выходу рыб из каналов в реку. Эта миграция становится особенно проблематичной при резком снижении притока воды. Огромное количество молоди усача остается в мелких и магистральных оросительных каналах, рисовых полях, сбросных водоемах. Отмечается, что часть молоди усача во время сбрасывания воды успевает подняться через оросительные каналы в реку, либо уходить в сбросные каналы [103].

Для проведения рыбоводных работ в августе и сентябре 2003 г., с разрешения Кызылординского областного территориального управления Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан была организована экспедиция для изучения и возможности отлова молоди усачей из пересыхающих ирригационных систем рисоводческих хозяйств Кармашинского района Кызылординской области. Группой было обследовано озеро, образованное дренажными водами сбросных каналов в окрестностях поселка Акжар и 11 точек на водоподающей и водосбросной ирригационной сети рисоводческих хозяйств. В ирригационной сети было отловлено 4 экземпляра аральского и 4 экземпляра туркестанского усачей, размером от 4 до 12 см. Облов каналов в августе 2003 года был затруднен высоким уровнем воды, и поздним началом осушения каналов. На нескольких участках рисоводческих хозяйств (Простое товарищество «Бекенов и КО», ПТ «Оразахун», ПТ «Ш – Интернационал, ПТ «Ш - Интернационал» и ПТ «Достык и Ко» и ТОО «Жусалы») было отловлено и промеряно 322 экземпляра молоди усача. Доля усача по подсчетам авторов в общем количестве учтенной рыбы составила около 0.59 %. Размеры молоди усача колебались от 6.0 до 16.0 см, масса - от 3.0 до 45.0 г, при средних показателях - 10.7 см и 16,3 г соответственно. Несколько экземпляров были переданы на кафедру зоологии и ихтиологии Казахского Национального Университета им. аль-Фараби для дальнейшего исследования [130].

Весной 2005 г. в устье р. Сырдарья сотрудниками Аральского филиала Казахского научно-исследовательского института рыбного хозяйства было отловлено и исследовано 17 особей взрослых усачей, морфологически отнесенных к аральскому усачу. Их длина без хвостового плавника составляла в среднем 44,3 см, а масса 1236 граммов. По половой принадлежности самок было вдвое больше, чем самцов, а возраст колебался от 3 до 7 полных лет.

В ирригационных каналах Кызылординского гидроузла в 2006 году, ближе к головной части было обнаружено несколько экземпляров усачей. При обследовании ирригационных каналов Кармакшинского района на рисоводческих хозяйствах около поселка Жусалы удалось также обнаружить усачей. Предполагалось, что в ирригационной системе молодь усача может быть представлена только сеголетками, которые вероятно выросли из пассивно скатившейся через водозаборы икры, однако в сборах разных лет встречались двухлетки и трехлетки. Вероятно, это связано с тем, что в ирригационную систему попадает не только икра, но и молодые рыбы, а также, что часть рыб попавших в рисовые чеки могла перезимовать в коллекторах, если не

промерзли зимой, или в ямах по трассе каналов. Вместе с тем, среди исследованных рыб отмечают особей с морфопатологическими изменениями в органах. Авторы предполагают, что это может быть результатом устойчивости отдельных экземпляров к действиям неблагоприятных факторов или смешения в ирригационной системе особей из относительно благополучных и сильно загрязненных участков бассейна [131].

Спасенная молодь в ТОО «Баубек-Баба» из рисовых чеков Кармакшинского района (рисунок 2).



А - лов молоди усача из рисовых чеков; Б - транспортировка спасенной молоди усача

Рисунок 2 – Лов и транспортировка молоди усача из рисовых чеков

Отлов молоди усача в коллекторах оросительных сетей Кызылординской области и выпуск ее в естественные водоемы не обеспечивает восстановления численности природных популяций, коэффициент промыслового возврата от выпуска такой молоди ничтожно мал. В связи с этим существует острая необходимость зарыбления водоемов более крупной молодью, способной быстро выйти из-под пресса хищных рыб и способствовать образованию локальных популяций. Одним из необходимых этапов является проведение эколого-генетического мониторинга РМС и выпускаемой молоди.

1.5 Биологические особенности усачей Арало-Сырдарьинского бассейна

Усачи в среднем половой зрелости достигают в 5-8 лет. Массовое созревание самок происходит в возрасте 7-8, самцов 6-7 лет. По достижении половой зрелости, после нагула в море, аральский усач, поднимаясь по рекам, совершал нерестовые миграции. Нерестовые скопления в море перед миграцией в реки начинались при температуре воды около 16°C. К предустыевым пространствам миграции состоялись в марте или начале апреля. Массовые, достаточно выраженные миграции усача в реки обычно отмечались в июне или августе. В реках усачи зимовали, а весной с наступлением нерестовой температуры начинали нерест. Основная масса самок после достижения

половой зрелости нерестится через сезон, изредка случается ежегодный нерест, что определяется скоростью накопления необходимых энергетических и трофических веществ. Нерестится усач в русле рек на участках за песчаными косами или островами с твердым дном, глубиной 1-2,5 м и хорошо выраженным, но не быстрым, обычно до 0,5 м/с, течением. В конце апреля начале мая при температуре воды 17-18 °С в Сырдарье усач начинает нереститься. Все лето продолжается икрометание, но наиболее интенсивно проходит при температуре 20-23°С. Нерест усача происходит в ночное время. Половые продукты выметаются в толще воды, где и происходит оплодотворение [103].

В Аральском море промысел усача обычно базировался на возрастных группах от 5+ до 8+, которые составляли в уловах около 80 % [132]. Максимальный возраст аральского усача в пределах Казахстана регистрировался в 22 года. Такая самка наряду была выловлена в 1959 г. в реке Сырдарье у города Кызылорда [133]. Уловы усача в 1950- годах приравнивались уловам воблы, занимавшей на Арале одно из первых мест по объему промысла. Добывался усач в Аральском море круглый год, но около 90 % всего вылова в периоды массовой нерестовой миграции к дельтам рек [132].

В литературе почти нет никаких сведений о биологии туркестанского усача из Аральского моря. Почти все имеющиеся публикации посвящены усачу рек и водохранилищ соседних Среднеазиатских республик. В пределах Казахстана есть некоторые материалы по Шардаринскому вдхр. [134; 135], Богеньскому [136], рекам Боген [137] и Чу [119]. Сроки достижения половозрелости у туркестанского усача растянуты. Так, в разных водоемах он впервые нерестится, достигнув возраста 2-7 лет, а основная масса рыб в 4-6 лет. Самцы обычно созревают на год раньше самок и в дальнейшем нерестятся не ежегодно, а через 2-3 года [119; 138-140]. Противоречивы и сведения о характере и местах нереста туркестанского усача. Некоторые авторы [140-142] предполагают, что эта рыба мечет икру в реках на течении с песчано-каменистым грунтом, одни [143;144] утверждают, что она нерестится в среднеазиатских водохранилищах. К сожалению, в литературе не описаны и наблюдения за нерестом, развитием икры и личинок усача. Плодовитость аральского усача гораздо выше, чем у туркестанского [145]. Максимальный возраст туркестанского усача в Богеньском вдхр. был отмечен Кузнецовой В.М., как 10+ лет [146]. В процессе полевой экспедиции летом 2011 г. [147] сотрудниками Научно-производственного центра рыбного хозяйства было промерено 30 особей усача из числа спасенной молодежи ТОО «Баубек-Баба» из рисовых чеков Кармакшинского района.

На территории Южно-Казахстанской области протекает река Арыс и является основным притоком р. Сырдарьи. Это зарегулированный водоток. Значительная часть стока в среднем течении через Арыс-Туркестанский канал используется для орошения сельскохозяйственных полей. В нижнем течении река Арыс зарегулирована Шаульдерской гидроэлектростанцией. Это также накладывает очевидный отпечаток на возможности адекватного обитания

ихтиофауны в реке. Основу ихтиофауны в верхнем течении составляют туркестанский усач [107]. Скот молоди рыб на ранних стадиях развития, возможен на всем протяжении реки, а миграции - связанные с питанием и нерестовые, возможны только на локальных участках. В районе впадения реки Бадам и вниз по течению на расстоянии до 15 км отмечались высокие концентрации туркестанского усача. В большинстве популяция туркестанского усача представлена особями длиной 25-40 см и весом от 300 до 1200 г. Концентрации усача в р. Арысь в районе впадения р. Бадам составляют от 8 до 31 шт на один километр. Наиболее разнообразен видовой состав ихтиофауны на нижнем участке р. Арысь ниже Шаульдерской ГЭС. Между тем, что русло реки до впадения в р. Сырдарья не зарегулировано, обитают и аральский и туркестанский усачи, однако численность туркестанского здесь ниже, чем аральского усача [107].

Длина их без хвостового плавника составляла в среднем 11,2 см, масса тела в среднем 34,4 г. Кроме того, летом в полевом журнале было отмечено что, в 2015 г. ниже Айтекской плотины (Кызылординская область) в реке Сырдарья, на ставные сети размером ячеек 40-70 мм было выловлено 16 особей аральского усача. У выловленных рыб измеряли длину и массу, отбирали чешую для уточнения возраста и после чего не травмируя выпустили в реку Сырдарья. Ихтиологическая длина рыб в среднем составила - 38,06 см, а масса в среднем 698 г. В категории возрастного состава аральского усача регистрировались пятилетние особи. Анализируя возрастной состав и размерно-весовые показатели аральских усачей, выловленных ниже Айтекской плотины в р. Сырдарья, было отмечено, что эти особи аральского усача принадлежат туводной форме, особи которых постоянно обитают и размножаются там же [147].

Таким образом, согласно литературным источникам, можно предположить, что в низовьях реки Сырдарья, вероятно, сохранились малые самовоспроизводящиеся популяции аральского и туркестанского усачей.

1.6 Полиплоидия у рыб и роль в видообразовании

Установлено, что кариотипы некоторых рыб характеризуются большим количеством хромосом. Разные виды различаются по структуре и форме хромосом [148;149]. В процессе эволюции наблюдались существенные преобразования кариотипов, которые приводили как к уменьшению, или к значительному увеличению числа хромосом. Большая изменчивость по кариотипам объясняется тем, что рыбы представляют собой древнюю, очень гетерогенную группу животных, эволюция которых длится несколько сотен миллионов лет [150].

Семейство карповые, содержит больше полиплоидных видов, чем любые другие группы рыб. Большинство полиплоидов в этом семействе являются либо тетраплоидами ($2n=100$), либо гексаплоидами ($2n=150$) [151;152], к примеру, диплоидный набор ($2n$) аральского усача состоит из 24 метацентрических, 46 субметасубтело - и 30 акроцентрических хромосом [153]. Род *Luciobarbus*

характеризуется высоким уровнем локального эндемизма, являясь тетраплоидным.

Полиплоидия у рыб была связана с такими признаками, как длительность жизни, быстрый темп роста, большие размеры тела и приспособляемость к окружающей среде [154;155]. Полиплоидия возникла независимо у различных отрядов рыб, и известно, что эти отряды наиболее богатые видами включают довольно большое количество полиплоидных форм, *Cypriniformes* оказался одним из отрядов с высоким количеством полиплоидных видов [156]. Интрогрессия и гибридизация обычны для пресноводных рыб, в частности для семейства карповые и в нем отмечаются различные уровни пloidности [80; 157;158]. К примеру, среди семейства карповых род *Barbus sensu lato* характеризуется как группа, включающая много видов. Для этой группы было предложено, по крайней мере, три события полиплоидизации, и тетраплоидия, по-видимому, развилась отдельно в двух случаях от предкового диплоидного состояния, тогда как гексаплоиды, по-видимому, были монофилетическими [159]. В этом отношении, другие роды появляются как сестринские группы некоторых монофилетических групп усачей, позволяет предположить, что гексаплоиды могли возникнуть в результате аллополиплоидии [80; 160]. Исследование гена в мтДНК, кодирующего цитохром b, у двадцати видов показало, что азиатские храмули — монофилетичная группа, возникшая, вероятно, путём аллополиплоидизации от тетраплоидных ($2n=100$) евразийских усачей рода *Luciobarbus* Heckel 1843 в среднем миоцене около 14 млн. лет назад [161]. Эволюционно аллотетраплоидное состояние *Luciobarbus* уже обнаружено Шенюил и др. [162].

Таким образом, полиплоидия, включая аллополиплоидию, по-видимому, сыграла роль в видообразовании усачей [80].

1.7 Применение молекулярно-генетического анализа для изучения вопросов филогенетики рыб

Изучение систематики и таксономического состава пресноводных рыб имеют большое практическое значение, поскольку достаточное количество таких данных способствует сохранению уникальных видов и в целом биоразнообразия [163-164]. Как правило, идентификация и таксономия видов рыб традиционно основываются на морфометрических и меристических характеристиках, таких как форма тела, количество лучей плавников или чешуйки боковой линии. Тем не менее, морфологические признаки не всегда стабильны на разных стадиях развития и часто не поддаются оценке в частности для редких и исчезающих видов. Кроме того, сходная морфология может вовсе затруднить определение видов рыб и оставить вопрос открытым для решения другими методами [165].

Соответственно исследования видовой принадлежности рыб требуют высокого уровня точности. Поэтому, морфологические методы в изучении таксономии видов требуют дополнительных молекулярных подходов. Большинство запутанных вопросов таксономии рыб, структуры вида и

внутривидовой изменчивости не могут быть решены с использованием традиционных морфологических методов и индикаторных признаков [166-168]. Кроме того, данные на основе маркеров мтДНК имеют ряд преимуществ перед морфологическими подходами. Во-первых, идентификация видов не требует полноразмерных экземпляров. Во-вторых, ДНК более стабильна, чем морфологические признаки, и более устойчива к деградации. В-третьих, возможность различить некоторые виды со схожими морфологическими характеристиками, такие как родственные виды. В-четвертых, ДНК неизменна на всех стадиях развития организма. Напротив, морфологические признаки могут изменяться в течение жизненного цикла, что приводит к появлению новых подвидов [169; 170].

На сегодняшний день существует множество молекулярных методов для изучения диких популяций рыб и искусственно выращиваемых [171].

Чаще всего в филогенетических исследованиях обычно используются маркеры митохондриальной и ядерной ДНК, обзоры приведены в статьях Ависе, О'Коннелл Райт, Халлерман, Паркер и др. [172-176].

Генетические маркеры в основном бывают двух типов: белковые и ДНК (молекулярные). Среди белковых маркеров очень популярны аллозимные маркеры. Молекулярные маркеры ДНК можно разделить на два класса: ядерные и митохондриальные [177]. Маркеры ядерной ДНК, такие как микросателлиты имеют бипарентальное наследование. Маркеры митохондриальной ДНК наследуются только по материнской линии, демонстрируют высокий уровень мутаций и не рекомбинируют, имеют четверть генетического эффективного размера популяции (N_e) ядерных маркеров [178].

Так как род *Luciobarbus* аллополиплоидный, то есть – тетраплоид образовавшийся в результате древней гибридизации, использование ядерных маркеров в изучении филогении было затруднительным, однако для правильной интерпретации эволюционной истории рода необходимо изучение ядерного генома.

Из-за полной дубликации генома большинство молекулярных исследований были основаны на аллозимном электрофорезе, митохондриальной ДНК, и реже на микросателлитах [76; 82; 84; 159; 179-184].

В контексте филогеографических исследований усачей их огромное генетическое разнообразие представляют собой очень интересную модель. Для защиты генетических ресурсов усачей необходимы исследования его генетической дифференциации и структуры популяции.

1.7.1 Применение ядерных маркеров ДНК

Последние три десятилетия наиболее популярными маркерами для популяционно-генетических исследований рыб являются микросателлиты – последовательности, состоящие из большого количества коротких повторов и отличающиеся высоким уровнем аллельного полиморфизма.

Одним из основных методов исследования ядерной ДНК является изучение аллельного состава микросателлитных локусов. Микросателлиты, вне зависимости от вида, могут сохранять свои свойства высоко-полиморфных генетических маркеров. В свою очередь, полиморфизм одних и тех же локусов в зависимости от вида может отличаться – вплоть до того, что локус, проявляющий высокий уровень полиморфизма у одного вида, может быть мономорфным у другого, даже филогенетически близкого вида. Именно эти регионы ДНК, не находящиеся под давлением отбора, эволюционируя со своей собственной скоростью, постепенно накапливают наследуемые в потомстве дифференциальные признаки, анализ которых позволяет проводить межвидовую, внутривидовую и индивидуальную идентификацию видов [185-189].

Некоторые микросателлитные локусы имеют очень большое количество аллелей на локус (> 20), что делает их очень полезными для применения, в идентификации родитель-потомок в смешанных популяциях, в то время как другие имеют меньшее количество аллелей и могут быть более подходящим для популяционной генетики и филогенеза [190;191].

Микросателлитные маркеры являются идеальными молекулярными маркерами, потому что они высоко полиморфны, равномерно распределены в геномах и кодоминантно наследуются. Они очень полезны среди различных типов ДНК-маркеров, поскольку их высокая степень полиморфизма и кодоминантного наследования позволяют проводить точный генетический анализ, максимизировать генерируемую генетическую информацию и разрешить филогенетические связи между видами (гибридов), родами и семействами [192].

Микросателлиты представляют собой последовательности, тандемные повторы из 1–6 пар нуклеотидов. Молекулярной основой микросателлитов является различие в количестве повторов [187;189;193].

Высокий уровень полиморфизма также указывает на то, что микросателлитные маркеры могут быть очень полезными для популяционно-генетического анализа. Микросателлитные локусы имеют небольшой размер, что облегчает генотипирование с помощью ПЦР. Недостатком является то, что микросателлитный анализ требует больших усилий, времени и затрат на создание панели, секвенирование и ПЦР-анализ праймеров, ко всему этому они могут иметь неспецифические полосы [187]. Микросателлиты могут амплифицироваться не только у тех видов, у которых они были идентифицированы, но и у других филогенетически близких видов. Характеристика и апробация большого количества микросателлитов для поиска подходящих локусов является утомительной и напряженной задачей [193]. Соответственно локусы были подобраны согласно таксономическому положению вида.

1.7.2 Применение митохондриальных маркеров ДНК

Анализ изменчивости мтДНК является альтернативой в изучении популяционной генетики рыб [194;195]. Скорость мутаций мтДНК примерно на порядок выше, чем у ядерного генома, а контрольная область особенно гипервариабельна, что позволяет проследить недавние изменения в эволюции вида [196]. Митохондрия является основным местом клеточного дыхательного метаболизма и возможным источником материнского эффекта программы генетического улучшения. Анализ мтДНК часто выявлял генетические различия между популяциями рыб. У рыб можно обнаружить три типа полиморфизма мтДНК: полиморфизмы вызванные добавлением пар оснований, делециями и гетероплазмией. Гетероплазмия мтДНК [196-198]- это наличие более чем одной формы (генотипа или гаплотипа) мтДНК. Гетероплазмия может быть результатом одного из двух механизмов. В редких случаях мтДНК могут быть вставлены и унаследованы от родителя-мужчины – отцовская утечка. Вторым механизмом может быть мутация в мтДНК. МтДНК кодирует гены и может влиять на продуктивность водных организмов [199]. Подобно ядерной ДНК, геном включает кодирующие и некодирующие области и мутирует намного быстрее [172].

Маркеры мтДНК популярны и пользуются успехом во многих генетических исследованиях, призванных ответить на вопросы филогении и структуры популяций рыб и могут способствовать получению информации о гибридизации и интрогрессии между рыбами, и обеспечивают критически важной информацией для использования в программах сохранения и восстановления видов [200].

Митохондриальный ген цитохрома *b* (*Cytb*) широко используется в систематических исследованиях для разрешения расхождений на многих таксономических уровнях в качестве молекулярного маркера для определения филогенетического родства [84; 201-211]. Так, гены цитохрома *b*, могут быть исследованы с большей пользой [212]. После коррекции и выравнивания примерно полная последовательность *Cytb* обычно составляет 1141 п.н [213]. Ген *Cytb* содержит как медленно, так и быстро эволюционирующие позиции кодонов, а также более консервативные и более вариабельные области [201].

1.7.3 Комплексный анализ ядерных и митохондриальных маркеров

Полиплоидность, сравнительно медленная скорость эволюции структурных генов рыб не позволяют отдать предпочтение одному виду ДНК-маркеров. Для увеличения достоверности результатов исследований генетической дифференциации часто используют ядерные и митохондриальные маркеры в комплексе [214].

Кроме того, данные мтДНК сами по себе имеют некоторые важные ограничения. Во-первых, мтДНК представляет собой только один локус. Так что мы можем смотреть только через одно окно эволюции. Это окно отражает в лучшем случае только историю материнской линии [215; 216], которая вполне может отличаться от общей истории популяций или видов. Поэтому вывод,

который мы делаем на истории вида, вероятно, будет сильно предвзятой, и потребность в дополнительных ядерных молекулярных маркерах для поддержки анализа мтДНК очевидна. Во-вторых, эффективный размер популяции мтДНК составляет лишь четверть размера ядерных аутосомных последовательностей; это означает, что линии мтДНК имеют гораздо более высокую скорость исчезновения аллелей [217].

Важно отметить, что не всегда существует соответствие между митохондриальными и ядерными генами [218-220] поскольку митохондриальный геном наследуется у рыб единообразно (по материнской линии) и поэтому его эффективная численность популяции в четыре раза меньше [221]. Следовательно, наследственные полиморфизмы со временем теряются быстрее, чем в ядерном геноме, поскольку эта скорость обратно пропорциональна эффективной численности [218]. Это особенно важно для аллополиплоидных организмов, таких как род *Luciobarbus* [222]. В целом существует тенденция к совпадению между результатами митохондриальных и ядерных генов в филогенетических и филогеографических исследованиях, и это было одной из причин создания штрих-кода для всех организмов на основе митохондриального гена *COI* (cytochrome oxidase subunit 1) состоящий примерно из 650 нуклеотидов [223].

По этой причине исследования, которые полагаются исключительно на митохондриальную ДНК для определения филогенетических отношений, рискуют создать генные деревья, которые не отражают истинные отношения между таксонами, и, когда это возможно, в эти анализы следует включать ядерные гены. Нашей целью было впервые использовать нейтральные ядерные маркеры, такие как микросателлиты, чтобы попытаться решить филогеографию рода *Luciobarbus* Арало-Сырдарьинского бассейна, мотивируя это запутанности в систематике усачей Казахстана и отсутствием генетических данных.

1.8 Генетическая паспортизация ремонтно-маточного стада в аквакультуре

В настоящее время распространена практика одомашнивания и искусственного выращивания рыб. Следовательно, необходимо применение наиболее совершенных способов мониторинга генетических процессов, протекающих в искусственно воспроизводимых популяциях и стадах рыб. Результаты молекулярно-генетических анализов должны ложиться в основу подбора пар производителей для скрещивания, селекции и получения жизнестойкого потомства с наименьшим отходом на стадиях развития и выращивания [224].

Молекулярно-генетические исследования рыб позволят достоверно определить таксономическую принадлежность каждой особи и составить индивидуальные генетические паспорта.

Основным показателем в генетическом паспорте являются микросателлитные маркеры, определяющие индивидуальность каждой особи, что важно для подбора пар производителей при скрещивании для получения

эффекта гетерозиса, повышения выживаемости личинок и мальков рыб и, соответственно, повышения качества выращивания [225].

Без применения генетических методов, качество пород рыб, используемых в аквакультуре со временем понижается. Все другие отрасли (животноводство и птицеводство) используют генетически улучшенные породы. Примеры применения генетических методов в аквакультуре пока редки.

При выращивании аквакультурных видов в зоне обитания диких видов приводит к непроизвольной гибридизации. Отсутствие признаков, адаптивных к локальным природным условиям ведет к деградации природных популяций. Генетические методы позволяют оценить уровень влияния аквакультуры на природную популяцию.

Популяция усачей в Арало-Сырдарьинском бассейне катастрофически сокращается, вероятно, в будущем популяция будет поддерживаться в основном за счет искусственного воспроизводства как происходит с видами рыб семейства осетровые обитающих в р. Жайык, а также для предотвращения критического исчезновения в будущем, как уже произошло в случае с лжелопатоносами рода *Pseudoscaphirhynchus* семейства осетровых [226] распространенных когда-то в этом же бассейне.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

Территория выборки охватывала большую часть известного ареала распространения. Все пробы были отобраны с соответствующими разрешениями (биологическое обоснование на изъятие аральского усача (*Barbus brachycephalus*) в научных целях из Арало-Сырдарьинского бассейна для формирования ремонтного стада и их последующего искусственного воспроизводства) от Комитета рыбного хозяйства Министерства экологии и природных ресурсов Республики Казахстан.

Отлов усачей проводился в летне-осенний период 2022 г. в пяти точках в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна (таблица 1).

Таблица 1 – Координаты точек сбора материала

№	Локация	Вид	n=81	Координаты	
1	с. Байыркум	<i>L. brachycephalus</i>	7	42° 7' 32.4"N	68° 8' 55.7"E
2	близ г. Кызылорда	<i>L. brachycephalus</i>	21	44° 57' 20.9"N	65° 19'32.6"E
		<i>L. conocephalus</i>	2		
3	Басыкара (гидросооружение)	<i>L. brachycephalus</i>	25	45° 45' 29.9"N	62° 19' 31.6"E
4	Рисовые чеки (ирригационные каналы)	<i>L. brachycephalus</i>	22	45° 16' 31.4"N	64° 14' 27.0"E
		<i>L. conocephalus</i>	2		
5	р. Бадам	<i>L. conocephalus</i>	2	42° 14'45.8" N	69° 45' 48.0" E

Согласно данным уловов, количество особей сокращается вдоль течения р. Сырдарья в южном направлении. Так, если в пределах Кызылординской области близ г. Кызылорда, гидроосоружения Басыкара и рисовые чеки количество особей варьировала от 21-25, то на территории Туркестанской области близ с. Байыркум и в р. Бадам отмечено от 2-7 экземпляров.

На карте нанесены точки сбора материала в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна, где локальности обозначены цифрами: 1-5 (рисунок 3).

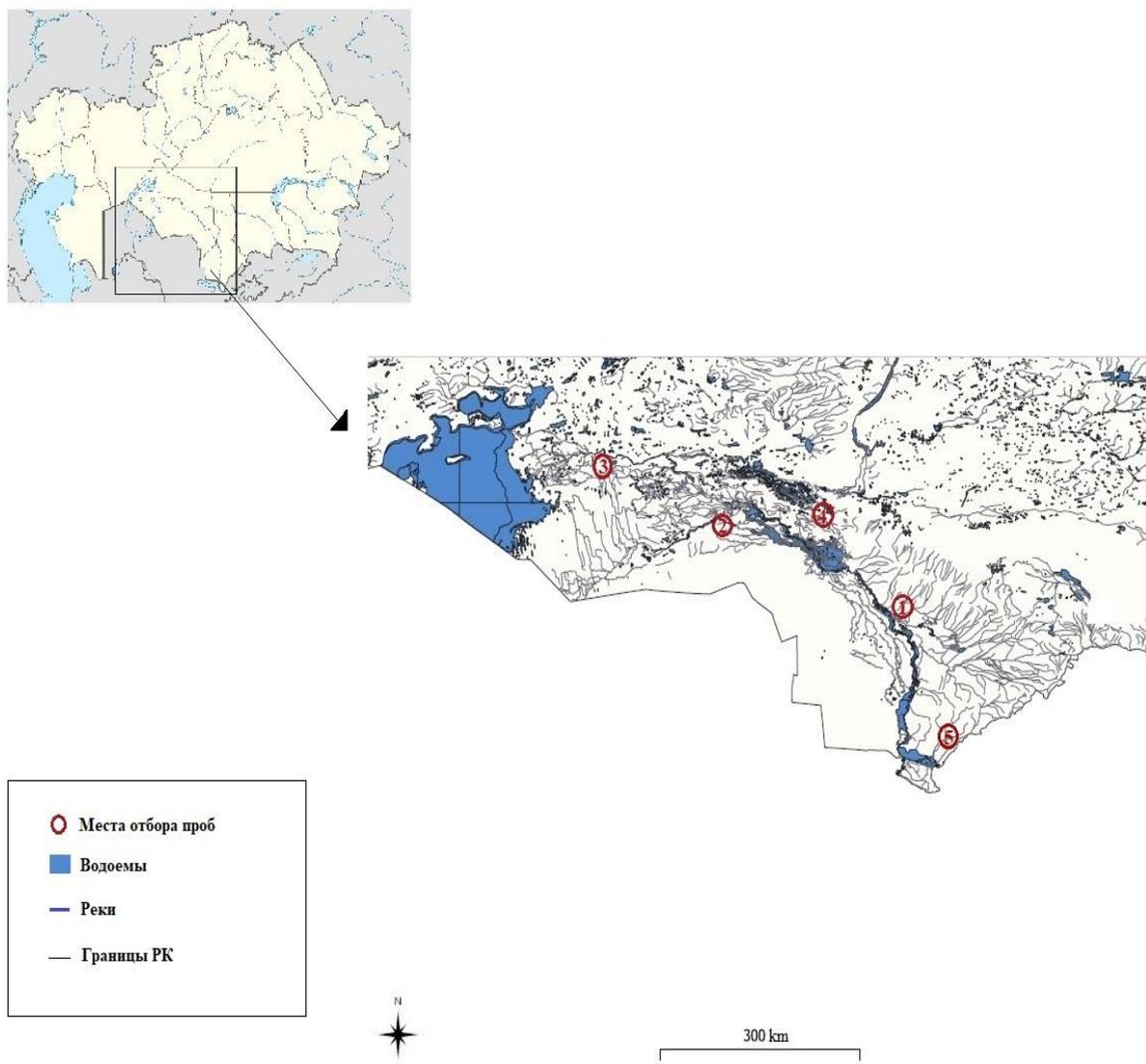


Рисунок 3 - Точки сбора материала в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна.

Отлов был выполнен капроновыми ставными и сплавными сетями с ячейей от 40 до 80 мм, толщина нити в пределах от 0,55 мм до 1,0 мм. При отлове производилась проверка ставных сетей через каждые 1,5-2 часа. Для сбора рыб на берегу водоема устанавливались садки. Объем садков составлял 1х0,8х0,8 м, размер ячеей 5х5 мм (фотографии приведены в приложении А., рис.А.3).

В период научно-исследовательских работ на рисовых чеках Кармакшинского района Кызылординской области (Приложение А., рис. А.1-А.6), во время проведения мелиоративных работ по спасению молоди для последующего биологического и морфологического анализов было зафиксировано 30 экз. молоди усача (рисунок 4) на месте, раствором 4% нейтрального формальдегида.



Рисунок 4 - Поимка молоди усача из рисовых чеков Кызылординской области

В качестве ваучерных образцов было зафиксировано четыре особи усачей в 40% растворе формалина и находится в коллекциях лаборатории генетики гидробионтов «Научно-производственный центр рыбного хозяйства».

Фрагменты плавников и один ваучерный образец пополнил коллекцию биобанка Национального музея естественных наук (MNCN-CSIC) (Мадрид, Испания) для предоставления возможности изучения другими исследователями.

2.1.1 Отбор половозрелых особей для формирования ремонтно-маточного стада

Неполовозрелые особи были выпущены живыми обратно в реку, за исключением выборки, потенциально близкой к половозрелой, была транспортирована в живорыбных емкостях вместе с сотрудниками Аральского филиала ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства» для формирования ремонтного стада методом доместикации и их последующего искусственного воспроизводства в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник».

Отобранные особи усача помещали в пластиковую бочку с водой вместимостью 50 л, плотно закрывавшуюся сверху крышкой, при этом бочки доверху заполняли водой с подачей кислорода. В одну такую бочку помещали

одновременно до трёх особей живых усачей общей массой до 5 кг. При транспортировке ствол должен находиться в вертикальном положении. Оптимальное время транспортировки усачей от сетей на берег, до временно установленных садков с живой рыбой – до 20–30 мин.

Транспортировка продолжалась от 1,5 до 2,0 часов. В рыбноводном хозяйстве особей усачей подсаживали в бассейны системы оборотного водоснабжения, расположенной в инкубационном цехе (рисунок 5).



Рисунок 5 - Посадка отобранных усачей для доместикации в бассейновых условиях

2.1.2 Краткая характеристика рыбноводного хозяйства

Эксперименты по искусственному воспроизводству аральского усача в Арало-Сырдарьинском бассейне проводятся на базе РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» имеющие на сегодняшний день подходящие условия и планы заниматься воспроизводством карповых видов рыб, в частности усачом.

Рыбопитомник оснащен соответствующим технологическим оборудованием и сооружениями для содержания производителей осетровых рыб, получения и инкубации икры и выращивания личинок. Разведением осетровых и зарыблением их молодю Аральского моря здесь занимались до 1967 года. В последующий период хозяйство перешло на выращивание молоди (сеголетков) других видов рыб - карпа, белого амура и толстолобиков для зарыбления водоемов озерных систем и стало работать как рыбопитомник. В хозяйстве построен и действует инкубационный цех для получения личинок карпа и растительноядных видов рыб.

Мощность производственных (выростных) прудов Камышлыбашского рыбопитомника (186 га). Рыбопитомник имеет маточное стадо карпа, белого амура, белого и пестрого толстолобиков. Мощность рыбопитомника составляет 14,8 млн. шт. сеголетков карпа и растительноядных рыб. Водоснабжение – механическое, из озера Камбаш и из р. Сырдарья. Рыбопитомник обеспечен

материально-техническими средствами в соответствии с производственными нормативами.

2.1.3 Отбор проб для молекулярно-генетического анализа

Для молекулярно-генетического анализа со всех точек сбора было отобрано 81 особь, затем с помощью стерилизованных ножниц у каждой особи был взят небольшой фрагмент (2x2 мм) грудного плавника. Ткани немедленно консервировали в 96% этаноле (позднее выдерживали при 4°C).

Отбор фрагмента ткани для дальнейшего выделения ДНК проводилось из не деструктивных для живого организма источников. Этот метод чрезвычайно важен для выделения ДНК исчезающих или находящихся под угрозой исчезновения видов. На рисунке 6 изображен процесс отбора фрагмента ткани грудного плавника в полевых условиях прижизненным методом.



Рисунок 6 – Отбор проб фрагмента грудного плавника для молекулярно-генетического анализа

Первичную идентификацию видов производили визуально по индикаторному признаку на месте улова, затем в лабораторных условиях, после чего фрагменты фиксированного биологического материала подвергались дальнейшей обработке.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Картирование точек сбора материала

Карты водоемов – рек, притоков и озер, а также места отбора проб созданы с помощью программы QGIS 3.22.13 [227]. Гидрографические shapefile (shp) файлы внутренних водоёмов и пространственных данных были взяты из

программы DIVA-GIS [228], которая поддерживает векторные (точечные, линейные), графические и сеточные типы данных.

Поиск точек отбора проб на карте был выполнен в QGIS 3.22.13, для этого были указаны географические координаты в Excel. Затем, на основе этих данных был создан векторный слой.

2.2.2 Проведение биологического и морфологического анализа

При работе использовали общепринятые методики биологического анализа рыб, который проводили согласно классическим схемам в ихтиологии для карповых видов рыб [229]. Научные названия видов рыб унифицированы по каталогам Эшмейера [230], Богуцкой Н.Г., Насеки А.М. [231]., и обновляемой электронной базе данных рыб FishBase [232].

Особь свыше 300 мм подверглись только биологическому анализу при формировании ремонтно-маточного стада, так как не представлялось возможным умерщвлять и фиксировать их в формалине, ввиду больших объемов тела и их статуса как редких и исчезающих видов заселенных в Красную книгу РК. Для морфометрических и меристических измерений были взяты образцы с рисовых чеков (ирригационные системы Кармакшинского района Кызылординской области) в количестве 30 особей (фотографии приведены в приложении А., рис.А.6). Возраст усачей соответственно определялся только у крупных особей для формирования ремонтно-маточного стада. Все особи были измерены электронным штангенциркулем (Matrix) согласно схеме сконструированной в программе TPSdigw32 [233] показанной на рисунке 7.

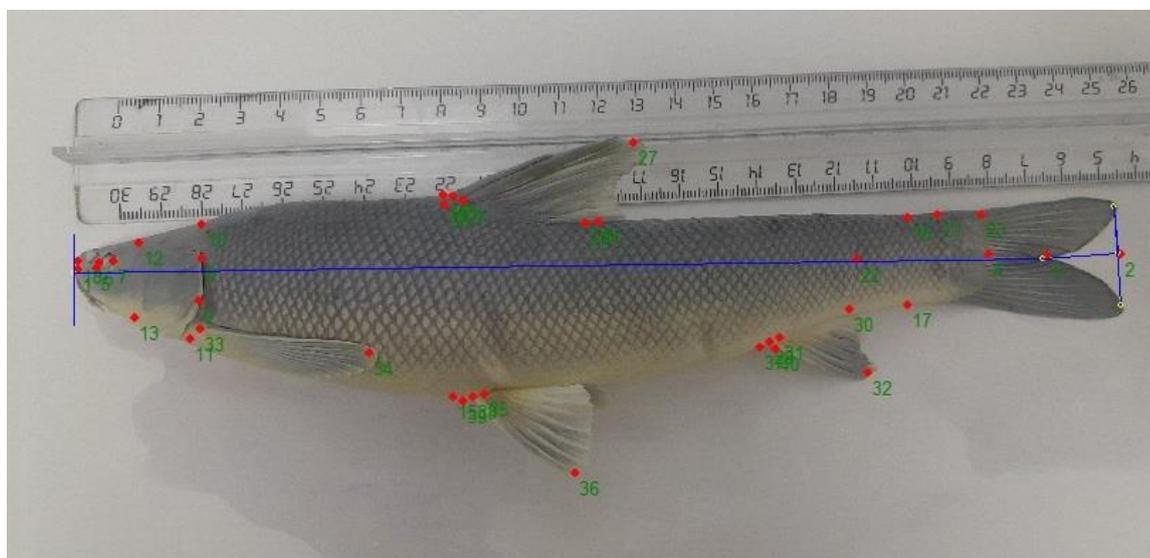


Рисунок 7– Схема точек морфометрических измерений

Морфометрический анализ включал основные *биологические*: L- длина всей рыбы; l - длина без хвостового плавника; Q- общий вес рыбы; *пластические и меристические признаки*: антедорсальное расстояние (aD), постдорсальное расстояние (pD), отношение aD/pD, расстояние между

грудными и брюшными (P-V), расстояние между брюшными и анальным плавниками (V-A), длина хвостового стебля (lca), длина основания спинного плавника (lD), наибольшая высота спинного плавника (hD), длина основания анального плавника (lA), наибольшая высота анального плавника (hA), длина грудных плавников (lP), длина брюшных плавников (lV), наибольшая высота тела (H), наименьшая высота тела (h), длина головы (lc), длина рыла (ao), диаметр глаза (горизонтальный) (o), заглазничный отдел головы (po), высота головы у затылка (hc), чешуй в боковой линии (l.l), над (sup) и под (into), лучей в спинном (D) и анальном (A) плавниках, тычинок на первой жаберной дуге (sp.br), barb1 и barb2 – длина первого и второго усиков от переднего края рыла к краю рта. Все измерения даются в мм.

2.3 Исследования генетической структуры рыб

2.3.1 Выделение геномной ДНК

Геномная ДНК рыб была выделена из плавников с использованием коммерческого набора DNeasy Blood & Tissue Kit согласно протоколу (Qiagen, Нидерланды) [234] на спин-колонках.

1. Фрагмент ткани весом 20 гр было перенесено в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

2. Было внесено 20 мкл протеиназы K, с тщательным перемешиванием на вортексе и инкубированием при 56°C до полного лизиса ткани. Во время инкубации чтобы диспергировать образец производились взбивающие движения вручную, а затем все было помещено на качающуюся платформу в течение ночи.

3. Все образцы были осаждены на вортексе 15 с. Было добавлено к образцу 200 мкл буфера AL. Затем было добавлено 200 мкл этанола (96–100%). Образцы, буфер AL и этанол тщательно смешались путем пипетирования до получения гомогенного раствора. Затем была добавлена смесь буфера AL и этанол. При добавлении буфера AL и этанола образовывался белый осадок.

4. Было внесено пипеткой смесь из шага 3 в спин-колонку, помещенная в пробирку для сбора на 2 мл. Центрифугирование проводилось при 8000 об/мин в течение 1 мин.

5. Спин-колонка была помещена в новую пробирку для сбора на 2 мл, с добавлением 500 мкл буфера AW1 и центрифугированием в течение 1 мин при 8000 об/мин.

6. Спин-колонка была перемещена в новую пробирку для сбора 2 мл, и добавлено 500 мкл буфера AW2 и центрифугирование в течение 3 мин при 14 000 об/мин, для высушивания мембраны. Важно высушить мембрану спин-колонки, так как этанол может мешать последующим реакциям. Этот этап центрифугирования гарантирует, что остаточный этанол не будет перенесен во время следующего элюирования. После этапа центрифугирования осторожно была извлечена спин-колонка, чтобы колонка не соприкасалась с протоком, так как это может привести к улетучиванию этанола.

7. Спин-колонка была перемещена в чистую микроцентрифужную пробирку в 2 мл и внесено 200 мкл буфера АЕ прямо на мембрану. Инкубирование при комнатной температуре в течение 1 мин, а затем центрифугирование в течение 1 мин при 8000 об/мин для элюирования. Для второго этапа элюирования была использована новая микроцентрифужная пробирка, чтобы предотвратить разбавление первого элюата. Во избежание контакта с элюатом спин-колонками, в микроцентрифужной пробирке было не более 200 мкл.

Все процедуры выполнялись строго в соответствии с инструкцией, разработанной в лаборатории молекулярной систематики Национального музея естественных наук MNCN (г. Мадрид, Испания).

2.3.2 Оценка чистоты выделенной ДНК

Чистота выделенной ДНК оценивалась по отношению оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм (Nanodrop One, ThermoScientific, США). Соотношение ДНК/белки рассчитывалось с помощью спектрофотометра.

2.3.3 Применения ядерных маркеров для оценки генетической структуры

Разработанные микросателлитные маркеры в MNCN-CSIC (Приложение Б, рис.Б.1.) были впервые протестированы в конце 2022 года на усачах Арало-Сырдарьинского бассейна. Ранее по неопубликованным и данным протокола лаборатории молекулярной систематики, представленные микросателлитные локусы были апробированы на европейских усачах Пиренейского полуострова, но результаты фрагментного анализа показали отрицательный результат.

В количестве 17 пар праймеров, амплифицированных для микросателлитных локусов, было перегруппировано в 4 набора по свойствам праймеров. Мультиплексы разводили в количестве 10 мкл каждого праймера, мультиплекс 1 (440 ddH₂O): *M1287, M1417, M1182*; мультиплекс 2 (400 ddH₂O): *M2237, M2108, M2044, M2164, M2306*; мультиплекс 3 (420 ddH₂O): *M3230, M3264, M3318, M3444*; мультиплекс 4 (400 ddH₂O): *M4211, M4455, M4215, M4138, M4474*.

2.3.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) ядерных маркеров

ПЦР проводилась в конечном реакционном объеме 12,5 мкл, содержащем 1 мкл ДНК (10 нг/мкл), 4 мкл чистой воды для ПЦР и 1,25 мкл смеси праймеров и 6,25 мкл набора для ПЦР Microsatellite Type-it (Qiagen, Нидерланды) с оптимизированным протоколом, где высокоспецифичная ДНК-полимераза HotStarTaq Plus и буферная система. Комбинация всех компонентов, содержащихся в мастер-миксе приводит к высокоспецифичной амплификации всех локусов параллельно. Оптимальный протокол ПЦР состоял из начальной стадии денатурации при 95°C в течение 5 мин, за которой следовали 30 циклов при 95°C в течение 30 с, 57°C в течение 90 с, 72°C в течение 30 с; 8 циклов: 95°C по 30 с, 53°C по 90 с, 72°C по 30 с; и заключительный этап удлинения при

68°C в течение 30 мин. Все ПЦР включали отрицательный контроль для проверки возможного загрязнения. Хвосты олигонуклеотидов присоединяли к 5'-концам праймеров для флуоресцентного мечения. Используемые хвосты олигонуклеотидов представляли собой универсальные последовательности M13 (GGA AAC AGC TAT GAC CAT), CAG (CAG TCG GGC GTC ATC) и T3 (AAT TAA CCC TCA STA AAG GG). Первоначально все три олигонуклеотида были помечены красителями PET, NED и VIC соответственно.

2.3.5 Получение данных электрофореза и секвенирование ядерных маркеров

Для получения данных электрофореза была подготовлена 2% агароза, затем было добавлено 10 мкл цианинового красителя, используемого в качестве красителя нуклеиновых кислот SybrSafe (ThermoScientific, США), 2 мкл красителя Cyan Yellow (ThermoScientific, США), по 3 мкл образца вместе с красителем было нанесено на лунки, включая 1 негативный образец без ПЦР продукта, в первую лунку 2 мкл маркера длин 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific, США), после чего было задано: 100 Вольт (V) на 30 минут. Данные электрофореза были проверены в системе гель-документирования, процесс захвата изображения электрофоретического геля выполнялись в программе GeneSnap Version 7.02.

Аmplифицированные продукты ПЦР обрабатывались на генетическом анализаторе ABI 3730XL DNA Sequencer, Applied Biosystems, США (250–500 стандартов размера LIZ).

2.4 Применение ядерных маркеров для генетической паспортизации

В работе были использованы следующие наиболее подходящие 10 микросателлитных локусов для генетической паспортизации производителей усачей, заимствованные из первоисточника [235]: *BC8*, *BC17*, *BC26*, *BC37*, *BC42*, *BC47*. В базе данных Whole-Genome-Shotgun contigs при помощи NCBI BLAST были взяты последовательности микросателлитных локусов: *Barb37*; *Barb54*, *Barb59*, *Barb79*, ранее опубликованных для обыкновенного усача *Barbus barbus* (Linnaeus, 1758) [236]. Химический синтез олигонуклеотидов (Приложение Б, рис.Б.2) и флуоресцентных красителей производился в ООО «Синтол», РФ в 2021-2022 гг.

2.4.1 Подбор ПЦР программы для генетической паспортизации

Реакция амплификации микросателлитной ДНК проводилась в конечном объеме 15 мкл из смеси праймеров: 10 пмоль/ мкл – 5 мкл; образец ДНК 3 мкл по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 95 °C – 3 мин; 35 циклов (плавление 95 °C – 15 сек, отжиг праймеров – 58 °C – 30 сек, синтез ДНК – 72 °C – 30 сек), досинтез ДНК при 72 °C – 5 мин. После окончания реакции от каждого образца отбиралось 1 мкл ПЦР смеси и переносилось в 15 мкл формамида HiDi с добавленным молекулярным стандартом (Ladder) для последующего определения размера амплифицированных фрагментов ДНК,

после чего проводилась денатурация при 95 °С в течение 5 мин. Фрагментный анализ для генетической паспортизации был проведен на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, РФ) с использованием The Quantum Dye v3.1.

2.5 Применение митохондриальных маркеров

2.5.1 Применение митохондриального маркера *Cytb* и подбор ПЦР программы

Два перекрывающихся фрагмента гена *Cytb* (1141 п.н.) амплифицировали с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) от каждой особи. Использовались праймеры со следующими последовательностями: GluDGL (5' TGACT TGAAR AACCAUCGTTG 3') [237] и H16460 (5' CGAYC TTCGG ATTAА СААГА ССГ 3') [238].

Двухцепочечная ДНК амплифицировалась в реакционных смесях объемом 25 мл (1 мл матричной ДНК, 2,5 мл Tris 3 10 PCR buVer, 2 мл MgCl₂, 1,5 мл 10 мМ каждого праймера, по 2,5 мл dNTP 200 нМ, 14,25 мл ddH₂O и 0,25 мл полимеразы Amplitaq (Perkin-Elmer, США). Протокол амплификации: 94°С в течение 120 с, 5 циклов при 94 °С в течение 45 с, 53 °С в течение 45 с и 72 °С в течение 90 с и 29 циклов при 94 °С в течение 45 с, 58 °С. С в течение 45 с и 72 °С в течение 90 с.

2.5.2 Получение данных электрофореза и секвенирование митохондриального маркера *Cytb*

Для визуальной детекции ПЦР продукта была подготовлена 1 % агароза 100 мл, затем было добавлено 10 мкл SybrSafe, и маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США) – стандарт для определения длины двухцепочечных молекул ДНК в интервале 250 – 10000 п. н. при анализе с помощью электрофореза в агарозном геле. Образцы были внесены в лунки камеры гель-электрофореза, один негативный образец и по 5 мкл каждого последующего образца, затем был задан режим: 100 Вольт (V) на 30 минут. Данные электрофореза проверялись в системе гель-документирования. Полученные фотографии редактировались по размеру электрофоретического разделения.

После проверки продуктов ПЦР на 1% агарозном геле с помощью ExoSAP-IT (USB, Кливленд, США) были очищены и секвенированы в Macrogen Europe Inc. [239] с использованием генетического анализатора ABI 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, США).

Все описанные молекулярно-генетические методы от выделения ДНК до секвенирования проводили в лаборатории молекулярной систематики Национального музея естественных наук MNCN (г. Мадрид, Испания).

2.5.3 Применение митохондриального маркера *COI* и подбор ПЦР программы

Амплификацию фрагментов гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *COI* проводили методом ПЦР. В процессе ПЦР использовали праймеры FishF2_t1

TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGA CTA ATC ATA AAG ATA TCG GCA C и FishR2_t1 CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A [240].

Профили цикла ПЦР были следующими: начальная денатурация в течение 5 минут при 94°C, затем 37 циклов по 1 минуте при 94°C, отжиг в течение 45 секунд при 55°C и удлинение в течение 1 минуты при 72°C, за которым следовали, окончательное удлинение в течение 10 минут при 72°C. Реакция амплификации была проведена в амплификаторе C1000/T100 (Bio-RAD, США).

2.5.5 Получение данных электрофореза и секвенирование митохондриального маркера *COI*

Продукты ПЦР были визуализированы на 1% агарозном геле, в объеме 8 мкл ПЦР продукт был загружен на поверхность агарозного геля и подвержен электрофорезу при 150 В в течение 30 минут. Размер ампликонов определялся использованием лестницы молекулярной массы в 100 пар оснований. Очищенные продукты ПЦР секвенировались напрямую как в прямом, так и в обратном направлении с помощью генетического анализатора (секвенатора) Нанофор 05 с BigDye™ TerminatorKit v.1.1/3.1 (Applied Biosystems, США). Прямые и обратные последовательности образцов были собраны с использованием пакета биоинформатического программного обеспечения Geneious Prime. После согласованного редактирования сгенерированные последовательности были вставлены и сопоставлены с базовым инструментом поиска локального выравнивания (BLAST) Национального центра биотехнологической информации (NCBI) для поиска молекулярной идентификации.

2.6 Обработка статистических данных морфобиологического анализа

Математическая и статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета анализа Excel на ПК. Статистическую обработку данных проводили согласно методическим рекомендациям Г.Ф. Лакина, для всех изученных признаков рассчитывалась упитанность по Фультону, среднее значение (M), среднеквадратическое отклонение (m) и коэффициент вариации (CV) [241]. По результатам морфометрии учитывали статистически значимые показатели при $p < 0,05$. Тест равных значений (one way ANOVA), анализ главных компонент и координат (principal component analysis, PCA, principal coordinates analysis, PCoA) выполнен с помощью программ PAST 4.03 [242].

2.7 Обработка и анализ молекулярных данных ядерных маркеров

После проведения фрагментного анализа были получены файлы в формате FSA (Приложение Б, рис.Б.3-Б11.), затем выполняли поиск аллелей с помощью GENEMAPPER 3.7 Applied Biosystems [243].

Генетическое разнообразие микросателлитов оценивались в программе GenoDive v.3.0. [244], что позволило провести анализ полиплоидных

организмов. Для этого были оценены следующие показатели: число аллелей на локус (N_A), эффективное число аллелей на локус (A_E), наблюдаемая гетерозиготность (H_o), гетерозиготность внутри популяций (H_s), общая гетерозиготность (H_t), скорректированная общая гетерозиготность (H_t) и коэффициент инбридинга (G_{is}). Генетическую дифференциацию между популяциями проводили на основе статистики $G'st$ [245]. Значение значимости этого параметра оценивалось с помощью 999 перестановок. Кроме того, использовали MICRO-CHECKER v2.23 [246] для изучения существования нулевых аллелей и оценки их влияния на оценку генетической дифференциации.

Для изучения структуры популяции использовалась модель, основанная на байесовской кластеризации. Количество популяций (K) с наибольшей апостериорной вероятностью (среднее значение $\ln\text{Prob}[D]$) было рассчитано с помощью программы STRUCTURE v2.3.4 [247] в предположении смешанной модели и равномерной априорной вероятности количества популяций K и маркировки плоидности из 4 (тетраплоидов), симуляций MCMC (Markov chain Monte Carlo) состояла из 1×10^6 итераций прижигания, за которыми следовали 1×10^5 итераций выборки. Кроме того, было рассчитано модальное значение λ , ΔK [248], чтобы сделать вывод о наилучшем значении K в Clumpak (Cluster Markov Package Across K). Проводилась оценка индекса фиксации (F_{st}) по данным генетического полиморфизма, которая является мерой дифференциации популяции, обусловленной генетической структурой. Если его значения варьируются от 0 до 1, где 0,15 — существенная дифференциация, а 1 — полная дифференциация [249].

Информативность полиморфизма (Polymorphism information content, PIC) [250] — способ оценки способности генетических маркеров выявлять полиморфизм среди особей, рассчитывали по следующей формуле (1):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (1)$$

Где, где k — число аллелей, P_i и P_j — частота соответственно i -го и j -го аллеля в популяции. Максимальное значение PIC для доминантных маркеров составляет 0.5.

Чтобы определить степень генетической структурированности среди уровней группировки, был проведен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) [251] для оценки процентной изменчивости частоты аллелей микросателлитов между каждой популяцией и внутри каждой популяции с группировкой их по местоположению выборки. Анализ частоты аллелей (Allele frequencies), формулу Харди-Вайнберга, AMOVA и Hybrid Index [252] проводили в программе GenoDive v.3.0 [253].

2.8 Обработка и анализ молекулярных данных митохондриальных маркеров

Для анализа митохондриального маркера гомологичные участки нуклеотидных последовательностей, полученные на секвенаторе в формате AB1 (chromatogram file or raw data) были выровнены в программе Geneious V.2022.2.2 [254].

Для изучения филогенетических отношений между изучаемыми видами все к собственным последовательностям добавили нуклеотидные последовательности других близкородственных видов из международной базы данных GenBank, *NCBI* в формате Fasta [255], для которых был секвенирован полный митохондриальный ген цитохрома b (1140 п.н.) и цитохромоксидазы *COI* (650 п.н.), выровнены с использованием MAFFT в Geneious и проверены вручную для максимизации гомологичных позиций.

Филогенетический анализ был выполнен с использованием байесовского вывода (BI), реализованного в MrBayes v.3.2 [256]. Анализ BI был выполнен с использованием двух независимых прогонов четырех связанных цепей Маркова Монте-Карло (MCMC) по 106 поколений в каждой для оценки апостериорного распределения вероятностей. Все последовательности были конвертированы в формат NEXUS и PHYLIP. Выборка топологий проводилась каждые 100 поколений, а дерево консенсуса по правилу большинства оценивалось после отбрасывания первых 10% поколений. Надежность клад оценивали с использованием байесовских апостериорных вероятностей и информационный критерий. Значения апостериорной вероятности (pp) использовались для оценки надежности филогенетического гипотеза.

Идентичные последовательности были преобразованы в гаплотипы с помощью веб-программы Alter [257]. Информационный критерий Акаике (AIC) [258], реализованный в jModeltest [259] был использован для определения эволюционной модели, которая лучше всего соответствует данным.

Филогенетическое дерево было представлено с помощью программы Figtree v1.4.4 [260], метода максимального правдоподобия Maximum Likelihood (ML) [261] и метода присоединения соседей Neighbour Joining (NJ) [262], реализованного на онлайн-сервере IQ-tree [263] и MEGA 11 [264]. Точность филогении максимального правдоподобия оценивалась с помощью метода UltraFast Bootstrap (1000 повторов) [265; 266]. Для оценки филогеографической структуры среди гаплотипов, присутствующих в нескольких обособленных бассейнах, сети гаплотипов были реконструированы с использованием алгоритма Median-joining [267], реализованного в программе PopArt [268].

Для оценки митохондриального генетического разнообразия использовался тот же набор данных, что и для анализа филогенетических отношений. Последовательности двух видов, являющихся объектом данного исследования, были проанализированы с помощью программы DNAsp v.5 [269] для определения количества гаплотипов (N_h), разнообразия гаплотипов (H_d), количество полиморфных сайтов (N_s), среднее количество различий между

нуклеотидными последовательностями (N_k), нуклеотидного разнообразия (π), стандартное отклонение (SD).

Был высчитан GC-состав (гуанин-цитозиновый состав), который при проведении ПЦР GC-состав праймера используется для предсказания температуры плавления этого праймера и температуры отжига. Высокий GC-состав праймера позволяет использовать его при высоких температурах отжига. Доля GC для одной из цепи ДНК. Процентный GC-состав вычисляется по формуле (2) [270]:

$$\text{GC}\% = \frac{\mathbf{G+C}}{\mathbf{L}} \times 100 \quad (2)$$

где $\mathbf{G+C}$ - суммарное количество гуанинов и цитозинов, а \mathbf{L} - длина цепи ДНК в нуклеотидах: $\mathbf{L} = \mathbf{A+T+G+C}$.

Были проведены тесты на нейтральность Тадзимы и F_s Фу (Tajima's, Fu's F_s) где с помощью статического метода проверки гипотезы нейтральной мутации с помощью полиморфизма ДНК [271; 272].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Биологическая и морфологическая характеристика усачей Арало-Сырдарьинского бассейна

По результатам проведенного отлова разновозрастных усачей обитающих в пределах Арало-Сырдарьинского бассейна с помощью ставных и сплавных сетей в пределах Туркестанской и Кызылординской областей были определены основные места скопления половозрелых особей. Так, в пределах Туркестанской области основным местом нереста является нижний бьеф Байыркумского гидросооружения. Данный участок реки относится №3 промышленному участку. Основными местами скопления старшевозрастных особей усача в границах Кызылординской области является нижний участок плотины Басыкара, а также район плотины Айтек.

Усачи морфологически очень близки и различаются лишь по небольшому числу признаков. Основой их разделения при совпадении ареалов служат экология обитания и образ жизни.

Подробный и на значительном материале сравнительный анализ морфологических признаков аральского усача был проведен в прошлом столетии М.И. Маркун [109] и Л.П. Павловской [111].

Морфологический анализ туркестанского усача бассейна р. Кашкадарья проводился Р.Г. Усмановой [110], когда еще численность этих видов была еще достаточно велика. По данным этих авторов все показатели пластических признаков усачей закономерно изменяются с длиной (возрастом). Павловской Л.П., было установлено, что у аральского усача наблюдается положительная корреляция с постдорсальным и вентро-анальным расстояниями, а отрицательная - длины тела с длиной головы, диаметром глаза, высотой головы.

Другие признаки имеют различную направленность в дифференциальных размерных группах. Так, например: есть признаки, показатели которых уменьшаются при достижении половозрелости, а затем становятся относительно стабильными или увеличиваются (длина рыла, ширина лба, заглазничный отдел головы, длина основания спинного плавника, антедорсальное расстояние, длина основания анального плавника, наибольшая и наименьшая высота тела) признаки, показатели которых увеличиваются при достижении половозрелости, а затем остаются без изменения (длина хвостового стебля) или уменьшаются (длина усиков). У туркестанского усача из реки Кашкадарья отношение антедорсального расстояния к постдорсальному так же изменяется с возрастом [110].

Возрастной состав усачей крупных особей представлен от 4+ до 8+, но доминирующими оказались пятилетки.

Известно, что коэффициент вариации (CV) позволяет оценить степень вариации или разброса данных относительно их среднего значения. Он выражается в процентах и используется для сравнения вариабельности различных наборов данных. Чем выше значение коэффициента вариации, тем больше разброс данных относительно их среднего значения.

Был проведен сравнительный анализ биологических, морфологических показателей аральского и туркестанского усачей, где статистические данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Морфо-биологические признаки аральского и туркестанского усачей

№	Признаки, единицы измерения	Аральский усач (n = 19) возраст 0+			Туркестанский усач (n = 11) возраст 0+		
		min-max	M± m	CV, %	min-max	M± m	CV, %
1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>L</i> , мм	96-163	129.5±33.5	25.9	61-150	105.5±44.5	42.2
2	<i>l</i> , мм	80-139	109.5±29.5	26.9	49-125	87.0±38.0	43.7
3	<i>Q</i> , г	6,3-34	20.15±13.85	68.7	1.7-32.0	16.85±15.15	89.8
4	Упитанность по Фультону	1,01-1,33	1.17±0.16	13.7	1,14-1,54	1.34±0.2	14.9
<i>B % от длины тела</i>							
5	<i>aD</i>	38,77-43,32	41.04±2.27	5.54	47,02-53,93	50.47±3.45	6.85
6	<i>pD</i>	44,23-50,62	47.42±3.19	6.73	35,70-44,67	40.18±4.48	11.17
7	<i>aD/pD</i>	0,76-0,78	0.77±0.01	1.29	1,10-1,30	1.20±0.10	8.33
8	<i>P-V</i>	23,00-28,74	25.87±2.87	11.08	22,30-29,03	25.66 ± 3.36	13.10
9	<i>V-A</i>	25,80-31,35	28.57±2.77	9.71	21,73-29,41	25.57±3.84	15.02
10	<i>lca</i>	18,13-19,87	18.50±0.87	4.7	15,24-20,22	17.73±2.49	14.05
11	<i>lD</i>	8,16-10,14	9.15±0.99	10.82	10,67-13,09	11.88±1.21	10.21
12	<i>hD</i>	16,32-22,12	19.22±2.90	15.10	19,37-25,27	22.32 ±2.95	13.22
13	<i>lA</i>	3,78-8,02	5.90±2.12	35.93	5,88- 11,76	8.82±2.94	33.28
14	<i>hA</i>	10,15-16,01	13.08±2.93	22.37	15,69-21,50	18.59±2.90	15.61
15	<i>lP</i>	14,21-17,10	15.65±1.44	9.22	15,65-21,53	18.59±2.94	15.78
16	<i>lV</i>	11,54-15,17	13.35±1.81	13.58	14,37-20,41	17.39±3.02	17.36
17	<i>H</i>	17,39-21,28	19.33±1.94	10.06	19,47-25,10	22.28±2.81	12.65
18	<i>h</i>	7,39-9,28	8.33 ±0.94	11.33	6,47-9,76	8.11±1.64	20.27
19	<i>lc</i>	17,19-24,81	21.00±3.81	18.14	22,79-27,51	25.15±2.36	9.38
20	<i>ao</i>	3,72-6,57	5.14±1.42	27.70	5,22-9,47	7.34±2.12	28.93
21	<i>o</i>	2,45-4,50	3.47±1.02	29.47	2,73-7,84	5.28±2.55	48.29
22	<i>po</i>	8,48-11,36	10.42±1.44	13.79	9,46-13,75	11.60±2.14	18.45
23	<i>hc</i>	10,10-13,78	11.94±1.84	15.40	14,24-21,53	17.88±3.64	20.36
<i>Счетные признаки</i>							
24	<i>l.l</i>	66-90	78±12	15.38	55-67	61±6	9.84

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
25	<i>sup</i>	10-14	12±2	16.67	11-14	12.5±1.5	12
26	<i>into</i>	8-12	10±2	20	8-10	9±1	11.11
27	<i>D</i>	6	6±0	-	8	8±0	-
28	<i>A</i>	5	5±0	-	6	6±0	-
29	<i>sp.br</i>	17-24	20.5±3.5	17.07	14-18	16±2	12.5
30	<i>barb 1</i>	4,02-7,08	5.55±1.53	27.57	4,43-8,52	6.47±2.04	31.60
31	<i>barb 2</i>	4,36-7,15	5.75±1.39	24.25	4,88-7,52	6.20±1.32	21.29

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%, то есть, характеризуя низкую вариабельность, данные считаются относительно однородными. CV от 15% до 30% умеренный разброс имеют данные пластических признаков. CV более 30% означающий высокую вариабельность относительно их среднего значения это вес рыбы (Q), который может варьироваться от компонентов питания и условий обитания.

3.2 Статистический анализ сходства морфометрических признаков усачей

Согласно проведенному анализу, можно отметить, что у туркестанского усача по сравнению с аральским, больше длина и высота головы, диаметр глаза, высота тела. Этим же объясняются и величины среднеквадратического отклонения (m) от среднего значения признака (M) и значения коэффициента вариации (CV). Вариабельность морфологических признаков усачей обоих видов заметна, но многие показатели перекрываются. Был выполнен анализ сходства всех морфо-биологических признаков (рисунок 8).

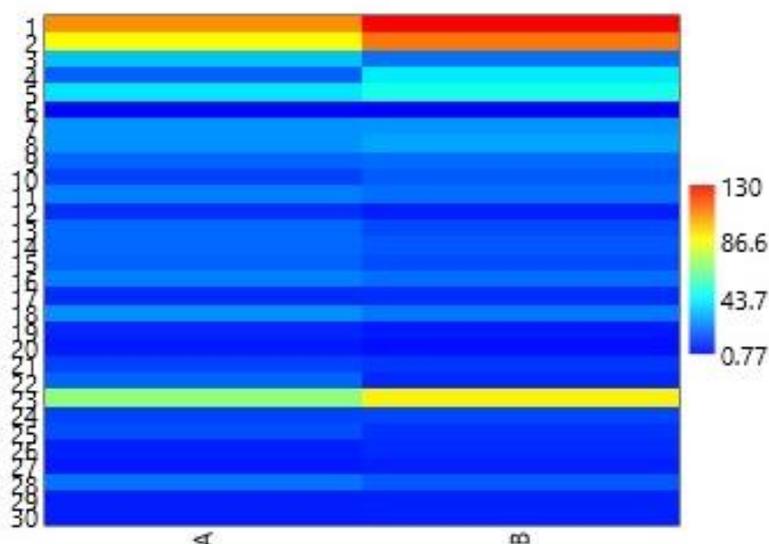


Рисунок 8 – Анализ сходства морфометрических признаков усачей; где, А - аральский усач; В- туркестанский усач

Проведенный тест равных значений (one way ANOVA) подтвердил различия (где достоверные различия $p < 0,05$); критерий Welch F в случае неравных дисперсий составил $p = 0,8757$. Анализ равных медиан основанный на сравнениях Краскела-Уоллиса, использовался для выявления различия Н критерий (с поправкой на равенство): 0,04762, где $p = 0,8273$.

Стоит отметить, что между видами отличительная вариабельность присуща такому признаку, как большее количество чешуй вокруг всей боковой линии у туркестанского усача по сравнению с аральским (рисунок 9).

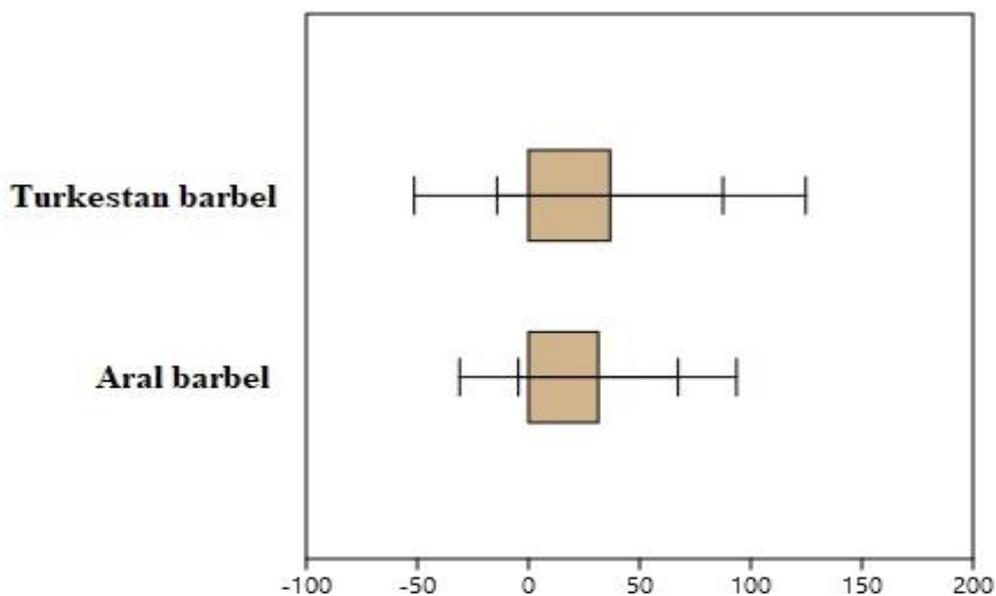


Рисунок 9 - Диаграмма на основе меристических данных количества чешуи усачей двух видов

Зачастую признаки взаимно перекрываются, хотя присутствуют колебания как меристических, так и пластических признаков и средние величины у обоих видов незначительно различаются. Результаты анализа демонстрируют, что усачи двух видов близки друг к другу по совокупности пластических признаков. На основе данных, был проведен анализ главных координат (РСоА) (рисунок 10).

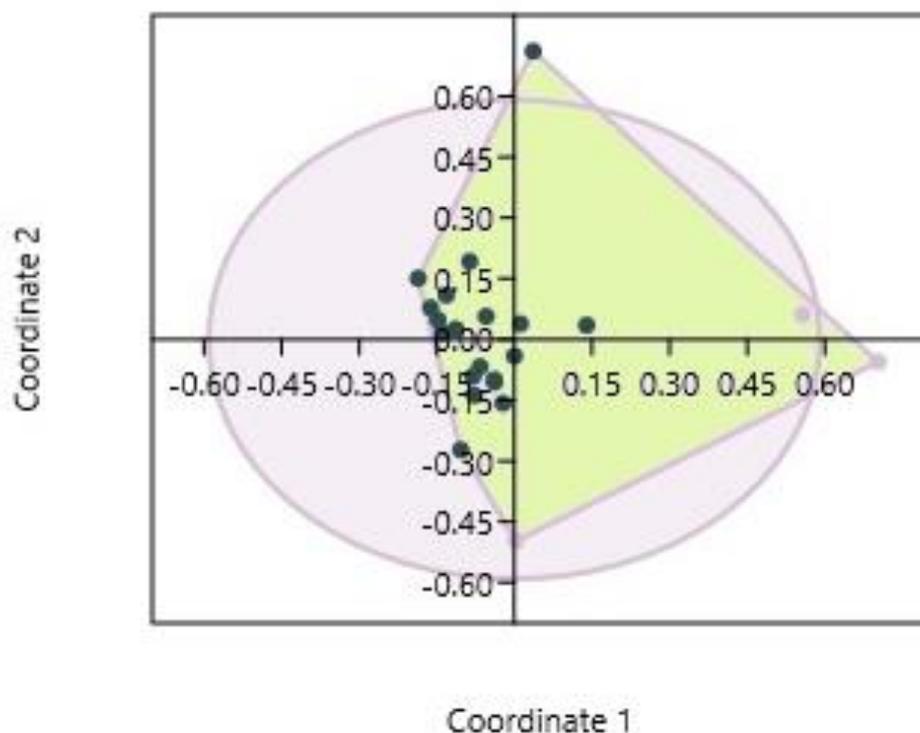


Рисунок 10 - Анализ главных координат по совокупности пластических признаков усачей, где овал - аральский усач; многоугольник - туркестанский усач

На первом и втором координатах наблюдаются небольшие различия по некоторым признакам, результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3- Нагрузки значений пластических признаков усачей на главных координатах

Оси	Собственное значение (Eigenvalue)	%
1	2	3
1	34677	98.672
2	466.57	1.3276
Признаки	Координат 1	Координат 2
<i>aD</i>	0.036073	0.71081
<i>pD</i>	0.13948	0.035036
<i>aD/pD</i>	-0.18635	0.15073
<i>P-V</i>	-0.048671	-0.040671
<i>V-A</i>	0.011229	0.039058
<i>lca</i>	-0.054645	0.056929
<i>lD</i>	-0.086465	0.19255
<i>hD</i>	-0.03871	-0.10551
<i>lA</i>	-0.13965	0.016011
<i>hA</i>	-0.077358	-0.13812
<i>lP</i>	-0.066619	-0.067134
<i>lV</i>	-0.080047	-0.09114
<i>H</i>	-0.038761	-0.09885
<i>h</i>	-0.13171	0.10933

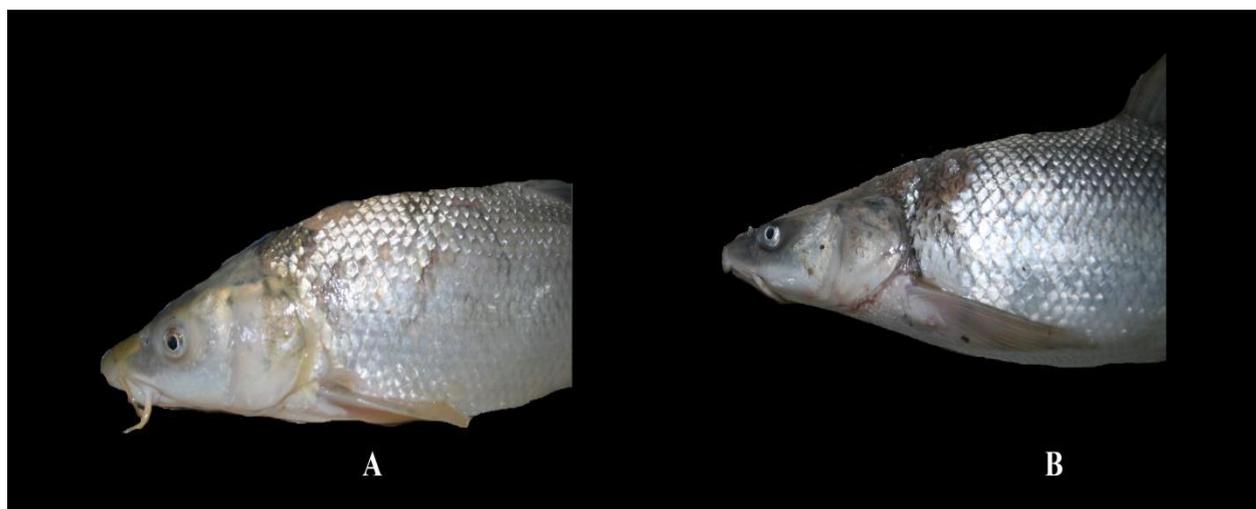
Продолжение таблицы 3

1	2	3
<i>lc</i>	-0.022041	-0.15751
<i>ao</i>	-0.14796	0.048587
<i>o</i>	-0.16207	0.077855
<i>po</i>	-0.11346	0.025813
<i>hc</i>	-0.10385	-0.2724

На первом главном координате наибольшую положительную нагрузку оказывает постдорсальное расстояние, отрицательную - длина спинного плавника. На втором главном координате нужно отметить наибольшую отрицательную нагрузку дают длина спинного плавника и наибольшая высота тела, наибольшую положительную - антедорсальное расстояние.

Между выборочными медианами нет существенной разницы. Большинство указанных признаков можно отнести к таковым, развитие которых зависит от условий обитания (мутность воды, скорость течения воды в реке, особенности питания и пр.), то есть величина этого признака может быть обусловлена не столько видовой специфичностью, сколько особенностями условия обитания усачей.

В третьем томе сводки «Рыбы Казахстана» [103], авторы отмечают у туркестанского усача желтовато-золотистую окраску тела, что спина у аральского усача обычно темнее брюха, с резко выраженной границей, а также наличие темных пятен у молодых особей. Наблюдения, проведенные в ходе исследований, только подтверждают данный тезис (рисунок 11).



А - туркестанский; В – аральский усач

Рисунок 11 – Отличительная характеристика окраски головы и тела некоторых особей

Так, по данным морфологического анализа Никольского Г.В., [273] в выборке встречались особи образуемые помеси, т.е. имеющие переходные признаки между двумя видами. На рисунке 12 автором диссертации изображен

вручную графический рисунок, где представлен предполагаемый переходный фенотип аральского с признаками туркестанского усача.

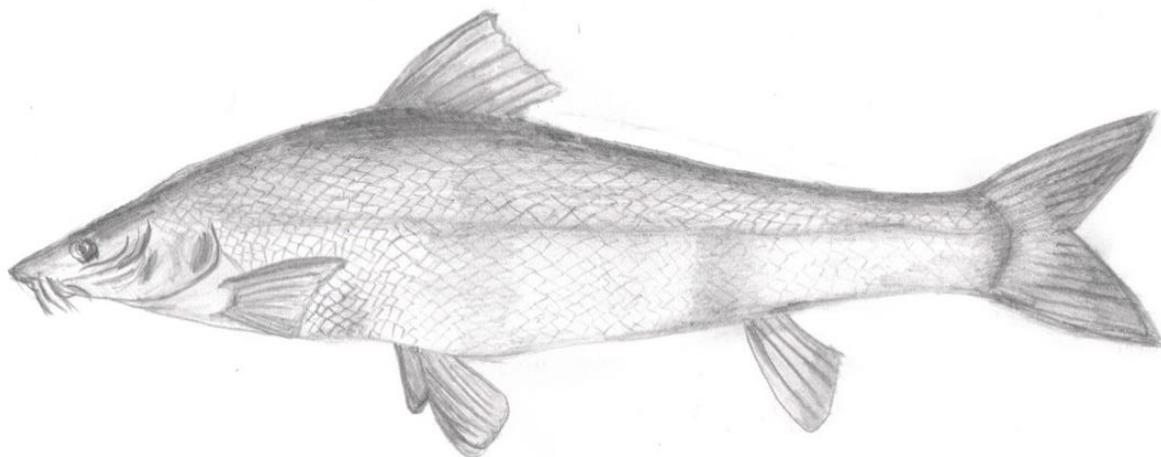


Рисунок 12 – Предполагаемый переходный фенотип аральского с признаками туркестанского усача

Таким образом, при анализе морфометрических признаков, следует учесть также высокую возрастную и локальную изменчивость разделительных признаков и проведение молекулярно-генетического анализа [274; 275] для точного определения существующих видов и гибридных форм.

3.3 Результаты генетического анализа усачей

3.3.1 Результаты оценки чистоты выделенной ДНК

Определение соотношения ДНК/белки составило 1,9 со средним значением, что указывает на ДНК достаточно хорошего качества и пригодности для дальнейшего анализа. Результаты средних значений спектрофотометрических измерений и концентрации ДНК нуклеиновых кислот (нг/мкл) составило 154.6 при A260/A280 – 1.9.

3.4 Результаты применения микросателлитных локусов для оценки генетического разнообразия

По результатам фрагментного анализа было получено 324 FSA файла. Были применены 17 пар праймеров, амплифицированных для микросателлитного анализа, они сгруппированы в 4 набора по свойствам праймеров, прямой и обратной последовательностям, ожидаемому размеру ампликона, повторяющемуся мотиву, хвосту праймера и типу используемого флуоресцентного маркера (таблица 4).

Таблица 4 - Молекулярно-генетическая характеристика нуклеотидных последовательностей микросателлитных локусов *Luciobarbus brachycephalus* Kessler, 1872 и *Luciobarbus conocephalus* Kessler, 1872

Наименование локуса	Прямой и обратный последовательности (5'-3')	Размер ампликона, п.н.	Повторяющийся мотив	Хвост праймера	Флуоресцентный маркер
M1287	F:TAATTAGCAACAGGCCCGCA R:TGCGTTCCCGTGTTTGAATG	170	(AG) ₁₀	T3	PET
M1417	F:CCAAGTCTCGCTATCCTCGG R:AAGAGGAGTGATGACAGCGC	114	(CCG) ₅	CAG	NED
M1182	F:GCTCTCGTTCCAGTCCAGAC R:AGCATCTGGCCATGATGGAG	193	(AATC) ₇	CAG	VIC
M2237	F:GAAGGTCACGTGGTTGTCCA R:AGGGAATTGGATGCAGCTCC	91	(AG) ₁₂	CAG	PET
M2108	F:GCTGCGGATTGGTCAAGAAC R:GCTCTTCTCCTCTCATCCGC	91	(AG) ₁₄	M13	NED
M2044	F:TATGCAGCTTCCACCCACTG R:GTTACAGCTGTTTGCTGGAG	103	(AC) ₁₀	M13	NED
M2164	F:GGCGTTGTTGAGCCAATCAG R:TGACTTTGGCAGGACGTGTT	91	(AGC) ₅	M13	VIC
M2306	F:CAGTCCCAGACTCTTCCAGC R:CCGGTGTGCGATCCAATCTA	302	(ATC) ₅	CAG	NED
M3230	F:ATTGAGGATCCCGAGGCTCT R:CGATAAGCCCGTGAGACGTT	149	(AGG) ₅	T3	PET
M3264	F:TGGTCATGCATGCGGTACAT R:AAGGTCACTGAAGTGCTGCA	159	(ACAG) ₆	T3	NED
M3318	F:AGTGAAAGCATGTCCAGGCA R:GGAAGTGGCCGTGAAATGG	217	(AG) ₁₈	CAG	VIC
M3444	F:ATGACTCAGGTGAAGCAGGC R:CCGCTCCTGCTTGACTTCAT	223	(AGC) ₇	CAG	VIC
M4211	F:CTAGACGAGCAGCACTGGAG R:CATTAGACAGCCGAGCCCTT	109	(AC) ₁₁	CAG	PET
M4455	F:TGTATGACGCTGGTTGGAGC R:ATGATACGATCCCAGCGCTG	110	(AC) ₁₁	M13	NED
M4215	F:CGAGCCGATCTCTGTCTGTG R:CCCAAACCCAAGAAAGTGCG	91	(AATC) ₁₀	M13	PET
M4138	F:CTGGCTGTCAACCTGTGGAA R:CTCCAGAGTCCGTACCTGGA	153	(AG) ₁₀	CAG	VIC
M4474	F:AACACTGACCATGTGACGCA R:CCAAGTCTGGTCCGGCATA	238	(AC) ₁₁	T3	PET

Для продолжения дальнейших этапов молекулярно-генетического анализа в качестве подтверждения были получены изображения электрофоретического геля амплифицированных локусов (рисунок 13).

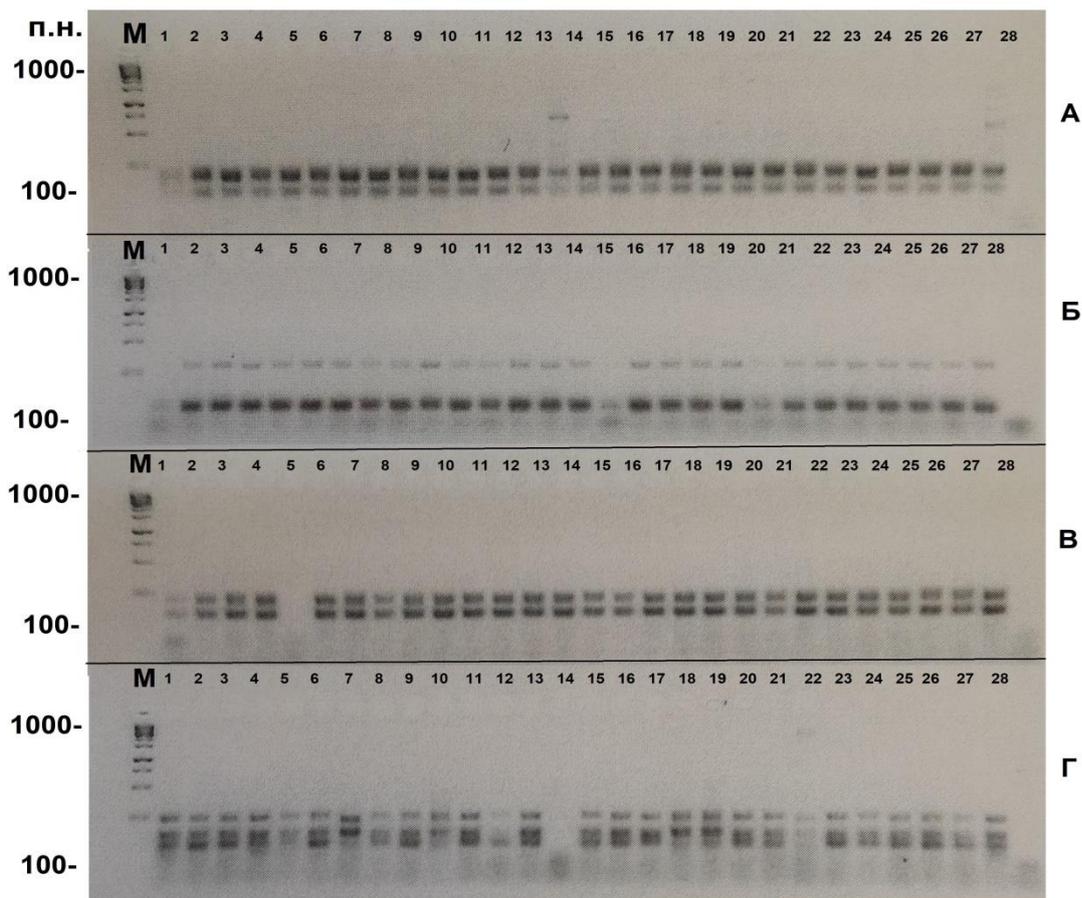


Рисунок 13 – Электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле ПЦР - продукта с видоспецифичными праймерами в мультиплексной реакции: М - маркер (стандартный) длин фрагментов с шагом в 100 п.н. (от 100 до 1000 п.н.); А – Г - мультиплексы 1-4;

Представленные образцы в четырех мультиплексах имели предельную чистоту и высокую концентрацию ПЦР продукта от 90 до 300 п.н. Результат проверки и оптимизации протокола амплификации микросателлитных локусов позволяет выбрать панель маркеров для дальнейших популяционно-генетических условий. Таким образом, амплифицированные локусы подтвердили видоспецифичность к изучаемым видам.

3.4.1 Оценка частоты нуль-аллелей и обнаружение мономорфных локусов

При проведении широкомасштабных популяционных исследований на разных видах животных, исследователи сталкиваются с проблемой нуль-аллелей. В популяционных исследованиях нуль-аллелем принято называть явление отсутствия ПЦР продукта, которое вызвано различными мутациями (делеция, инсерция, инверсия и единичная замена) в микросателлитных последовательностях ДНК.

Согласно результатам в MICRO-CHECKER анализы не показали признаков тневых полос или ошибок генотипирования, а частота нуль-аллелей

была низкой. По данным полученных результатов, из семнадцати локусов пятнадцать успешно прошли этап амплификации, два локуса *M3318* и *M4455* отмечены отсутствием ПЦР продукта.

3.4.2 Оценка генетического разнообразия аллелей по микросателлитным локусам

Известно что, микросателлиты обладают высоким полиморфизмом и хорошо дифференцируют популяции [276; 277]. На данный момент уже проведены большие исследования по микросателлитной изменчивости многих видов рыб и закрепились как надежные маркеры для исследования межпопуляционных различий [278-280].

Согласно частотам аллелей 15 проанализированных локусов среди 81 особей, общее количество аллелей составило 90, учитывая процент отсутствующих данных 10, 93%. Количество аллелей на локус колебалось от 2 до 12, информативность полиморфизма (PIC) составила 0,774. Один локус, *M2108*, значительно отклонялся от равновесия Харди-Вайнберга ($P = 0,0001$).

Что касается генетического разнообразия видов и популяций, то среднее число аллелей по каждому локусу было выше у *L. brachycephalus* Кызылординской области (4,5), Басыкара (5,0), рисовые чеки (4,8). Напротив, средние аллели были ниже для популяций близ села Байыркум (3,2) и для *L. conocephalus* из р. Бадам (1,8). Эффективное количество аллелей колебалось от 1,8 до 2,7. Образец более низкого генетического разнообразия в реке Бадам у *L. conocephalus* также соответствовал результатам анализа гетерозиготности. В целом отличалось меньшим генетическим разнообразием *L. conocephalus* (таблица 5).

Таблица 5 - Показатели генетического разнообразия *L. brachycephalus* и *L. conocephalus* по точкам отбора проб Арало-Сырдарьинского бассейна

Точки отбора	N_a	N_e	H_o	H_e	G_{is}
с. Байыркум	3.267	2.283	0.518	0.497	-0.042
близ г. Кызылорда	4.533	2.653	0.578	0.546	-0.058
Басыкара (гидросооружение)	5.067	2.707	0.540	0.539	-0.001
Рисовые чеки	4.667	2.659	0.557	0.552	-0.008
р.Бадам	1.867	1.812	0.433	0.428	-0.014

N_a : количество аллелей; N_e : эффективное количество аллелей; H_o : наблюдаемая гетерозиготность; H_e : ожидаемая гетерозиготность; G_{is} : коэффициент родства.

Из семнадцати протестированных микросателлитов пятнадцать локусов успешно амплифицировались и характеризуются полиморфностью; два локуса (*M3318* и *M4455*) явились мономорфными и были исключены из последующего анализа. Из пятнадцати амплифицированных локусов *M2044*, *M4215* и *M1287* показали более высокую степень полиморфизма со средним значением 6 (таблица 6).

Таблица 6 - Показатели генетического разнообразия по локусам

Локус	N_a	N_e	H_o	H_s	H_t	H'_t	G_{is}
M1287	11.000	2.946	0.827	0.699	0.730	0.738	-0.184
M1417	3.000	2.640	0.879	0.650	0.646	0.645	-0.353
M1182	5.000	2.678	0.821	0.660	0.695	0.704	-0.243
M2237	5.000	1.409	0.186	0.320	0.321	0.321	0.420
M2108	3.000	1.057	0.037	0.057	0.055	0.055	0.341
M2044	12.000	5.093	0.911	0.842	0.860	0.864	-0.082
M2164	3.000	1.062	0.041	0.064	0.061	0.061	0.357
M2306	2.000	1.584	0.242	0.390	0.476	0.497	0.380
M3230	2.000	1.996	0.654	0.514	0.503	0.500	-0.273
M3264	6.000	2.403	0.758	0.602	0.591	0.588	-0.259
M3444	8.000	2.885	0.824	0.675	0.676	0.676	-0.221
M4211	4.000	1.514	0.255	0.357	0.374	0.378	0.288
M4215	9.000	3.030	0.237	0.721	0.811	0.833	0.672
M4138	5.000	2.145	0.715	0.550	0.542	0.540	-0.300
M4474	12.000	2.430	0.490	0.618	0.738	0.768	0.207
<i>M</i>	6.000	2.325	0.525	0.515	0.539	0.545	-0.020

N_a : количество аллелей; N_e : эффективное количество аллелей; H_o : наблюдаемая гетерозиготность; H_s : гетерозиготность внутри популяции; H_t : общая гетерозиготность; H'_t : скорректированная общая гетерозиготность; G_{is} : коэффициент инбридинга; *M* - среднее значение.

Оценка генетического разнообразия по остальным локусам была следующей: по количеству аллелей на 15 локусов от 2 до 12 (рисунок 14).

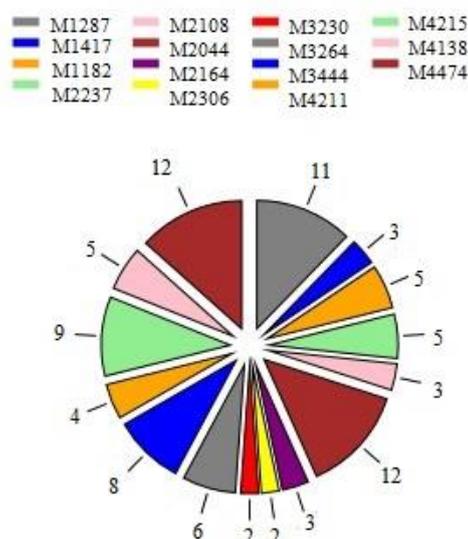


Рисунок 14- Результаты оценки генетического разнообразия по количеству аллелей на локус

Число аллелей на локус колебалось от 2 до 12 (в среднем 6). Наблюдаемая гетерозиготность и общая гетерозиготность колебались от 0,037 до 0,911 (в среднем 0,525) и от 0,055 до 0,860 соответственно.

Наибольшее эффективное число аллелей составило 5,093 для локуса *M2044* и 3,030 для локуса *M4215*; наблюдаемая гетерозиготность колебалась в пределах 0,911-0,715 для локусов *M2044*, *M1287*, *M1417*, *M1182*, *M3264*, *M3444* и *M4138*; гетерозиготность внутри популяции отмечена по локусам: *M2044*-0,842, *M4215*-0,721 и *M1287*-0,699, высокие значения общей гетерозиготности выявлены по локусам с наибольшим числом аллелей от 8 до 12, *M2044*-0,860, *M4215*- 0,811, *M4474*-0,738, *M1287*-0,730 и *M3444*-0,676.

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. В исследованных популяциях *L. brachycephalus* популяция, наиболее близкая к устью Аральского моря, имела наименьшее разнообразие. Значения коэффициента кровного родства оказались статистически значимыми для всех исследованных популяций, за исключением популяции *L. brachycephalus* из рисовых чеков, расположенной в верховьях водораздела р. Сырдарья.

3.4.3 Оценка генетической изменчивости усачей

Анализ AMOVA показал, что самый высокий процент генетической изменчивости среди образцов *L. brachycephalus* из четырех отобранных популяций составляет 98,4 % по компоненту «внутри особей», по сравнению с низким процентом генетической изменчивости, объясняемой «среди популяций» 1,6 % соответственно. Кроме того, попарное генетическое расстояние и генетическое сходство оценивали по формуле Нея (статистика $G'st$ в таблице 7), получая значения генетического расстояния в диапазоне от 0,10 до 0,136 для популяций двух анализируемых видов.

Таблица 7 - Значения Gst для 5 исследуемых участков Арало-Сырдарьинского бассейна

Точки отбора				
с. Байыркум	г. Кызылорда	Басыкара	Рисовые чеки	р. Бадам
0.020	0.047	0.047	0.022	0.136
0.047	0.020	0.010	0.016	0.073
0.047	0.010	0.020	0.018	0.072
0.022	0.016	0.018	0.020	0.101
0.136	0.073	0.072	0.101	0.020

Таким образом, значения $G'st$ в целом были низкими, даже с учетом сравнения между *L. conocephalus* (точка отбора 5) и любым из местонахождений, населенных *L. brachycephalus*.

3.4.4 Генетическая структура рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 основанная на ядерных маркерах

При выявлении структуры популяции анализируемых усачей из разных точек отбора проб Арало-Сырдарьинского бассейна, гистограммы показали разделение прогонов.

Значения $K=5$ оказались информативными для объяснения генетической структуры представителей рода *Luciobarbus*. Генетическая дистанция представлена парными оценками $F_{st}/(1-F_{st})$ среди популяций, которые регрессируются по отношению к географическому расстоянию. По моде для оптимального количества кластеров составило $K=5$, как показано в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты сводки симуляций в программе STRUCTURE v2.3.4

К	Ln P(D)	Fst_1	Fst_2	Fst_3	Fst_4	Fst_5
1	-4657.0	0.0043	-	-	-	-
2	-4484.4	0.3688	0.0361	-	-	-
3	-4376.9	0.3802	0.0591	0.0508	-	-
4	-4301.2	0.3822	0.1419	0.0572	0.0488	-
5	-4254.5	0.0736	0.1618	0.0770	0.0353	0.0579

K - кластеры; *Ln P(D)* - \pm стандартное отклонение; *Fst* – индекс фиксации

Полученные значения дифференциации популяции, обусловленной генетической структурой находятся в диапазоне от 0.0043 до 0.3822. Значения варьируются от 0 до 1, где 0,15 — существенная дифференциация, а 1 — полная дифференциация. Нулевое значение означает панмиксию, то есть популяции свободно скрещиваются. Значение единицы подразумевает, что вся генетическая изменчивость объясняется структурой популяции, и что две популяции не имеют общего генетического разнообразия, приближенные данные к единице отмечены в кластере 5, где подразумеваются особи туркестанского усача. Кластер 1, то есть точка отбора с. Байыркум достаточна изолирована от всех точек сбора, где вовсе отсутствуют результаты индекса фиксации.

Для анализа взаимосвязи двух видов применение STRUCTURE v2.3.4 к данным STR оказалось информативным. Структурный анализ не выявил четкой генетической структуры между четырьмя популяциями аральского усача *L. brachycephalus* (1-4), которые были заметно отделены от места отбора проб 5, представленного как туркестанский усач *L. conocephalus* (5). На рисунке 15 представлена диаграмма, по результатам Байесовской кластеризации (STRUCTURE v2.3.4) на наборе данных STR усачей, где цвета представляют среднюю долю принадлежности (sort by Q) к каждой из предполагаемых групп.

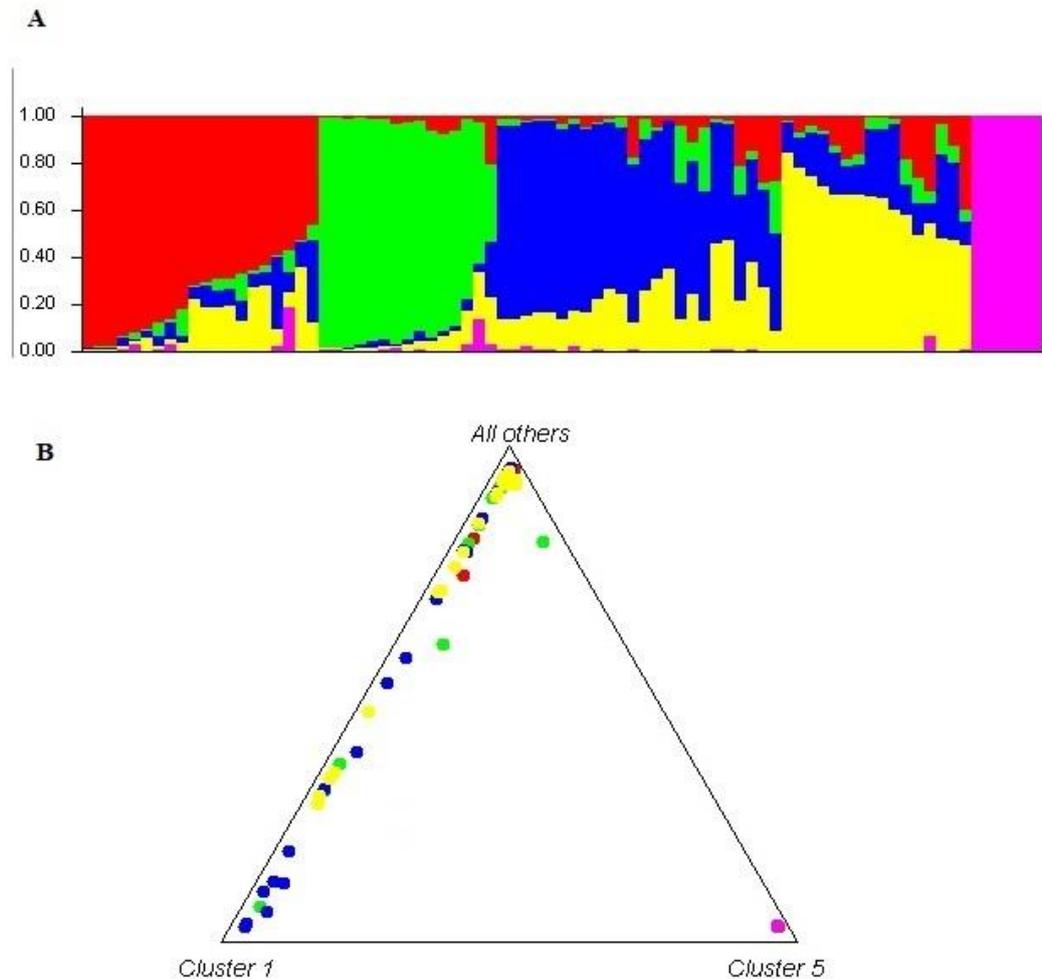


Рисунок 15 - Генетическая структура аральского и туркестанского усачей
 А - столбчатый график, сгруппированный по кластерам; В - треугольный график, показывающий распределение двух видов в пяти кластерах.

В представленном столбчатом графике можно отметить, как оба вида в целом разделяются на два кластера: один группирует смешанную популяцию *L. brachycephalus* (точки 1-4), а другой принадлежит виду *L. conocephalus* (точка сбора 5).

Столбчатые диаграммы, где каждая принадлежность усачей представлена одной вертикальной линией, и эта линия показывает цветные сегменты, представляющие относительный процент членства в кластере. Стоит отметить, что у некоторых особей, принадлежащих к участкам 1-4 выборки *L. brachycephalus*, отмечается незначительное присутствие (К-5) генотипа *L. conocephalus*. Программное обеспечение определило $K = 5$ как наиболее вероятное число генетических кластеров в исследуемых образцах (Рисунок 16).

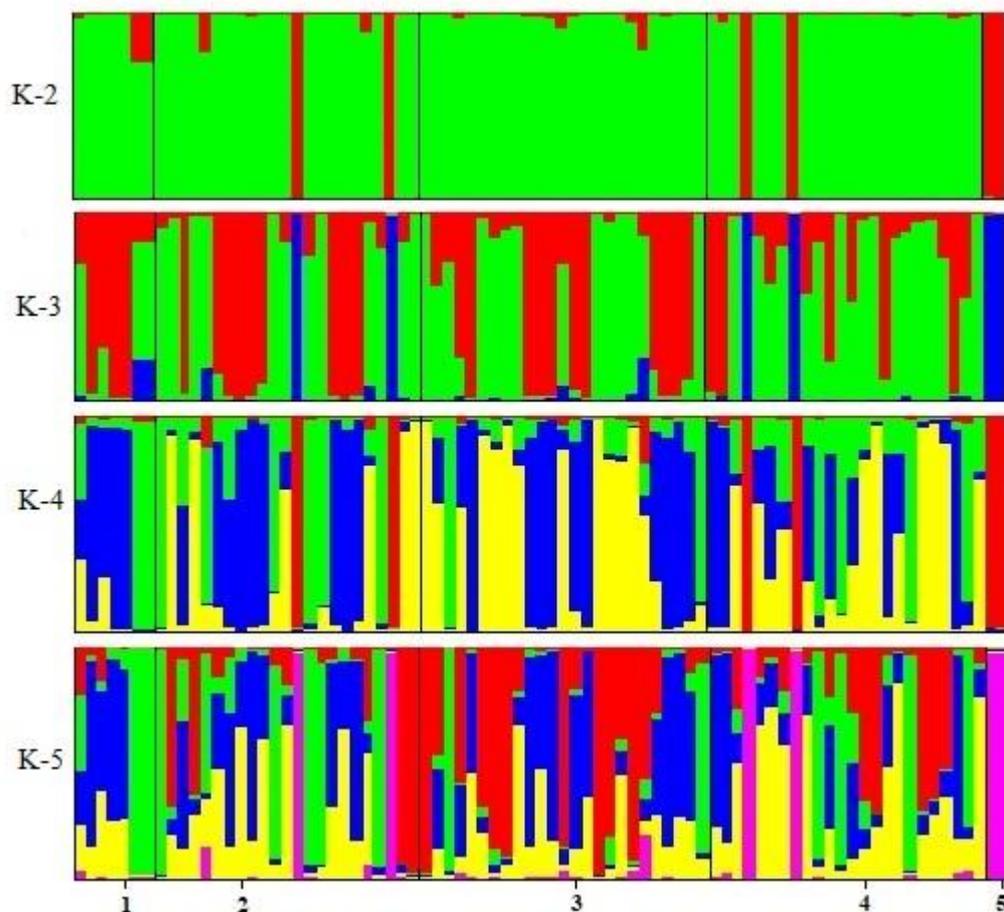


Рисунок 16 – Генетическая структура аральского и туркестанского усачей. Байесовская кластеризация на наборе данных STR выполненная с помощью STRUCTURE v2.3.4 после коррекции Эванно (CLUMPAK) для определенного числа $K = 1-5$; где 1: село Байыркум (*L. brachycephalus*); 2: близ г. Кызылорда (*L. brachycephalus*; *L. conocephalus*); 3: Гидросооружение Басыкара (*L. brachycephalus*); 4: Рисовые чеки (*L. brachycephalus*; *L. conocephalus*); 5: р. Бадам (*L. conocephalus*).

Согласно анализу первичных данных, четыре экземпляра (вертикальная линия, отображенная розовым цветом) из точек отбора 2 и 4 (близ г. Кызылорда и рисовые чеки) в действительности являются туркестанским усачом, а не являются результатом интрогрессии, как предполагалось ранее. Судя по всему, в полевых условиях эти четыре экземпляра подвергнутые морфологическому анализу были ошибочно идентифицированы как аральский усач, но генетический структурный анализ показал, что они принадлежат к другому виду - туркестанскому усачу. Также стоит отметить, что в этих местах впервые отмечены туркестанские усачи, хотя традиционно там встречается аральский усач.

В генетике интрогрессия, также известная как интрогрессивная гибридизация, представляет собой перенос генетического материала от одного

вида в генофонд другого путем повторного обратного скрещивания межвидового гибрида с одним из его родительских видов.

Однако анализ подтвердил низкий уровень интрогрессии генотипов *L. conocephalus* у *L. brachycephalus* в байесовском кластере, что указывает на ограниченный генетический обмен аральского с туркестанским усачом [281]. Анализ байесовской структуры с использованием микросателлитов выявил различия между особями двух видов, однако, у *L. conocephalus* не было обнаружено никаких доказательств внутривидовой генетической структуры и генотипов *L. brachycephalus*. Предполагается что это связано хоть и незначительным, но имеющимся расстоянием обитания двух видов в Арало-Сырдарьинском бассейне.

3.4.5 Анализ частных аллелей для рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 при идентификации по ядерным маркерам

Проведенные исследования рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 применяя уникальные ядерные маркеры, эффективно разграничило эти два вида без каких-либо двусмысленностей. Согласно полученным результатам, эти микросателлитные локусы также могут быть использованы для внутривидовой генетической идентификации, поскольку особи *L. conocephalus* демонстрируют четкую дифференциацию при разделении на кластеры. С этой целью мы также отметили частные (приватные) аллели для *L. conocephalus*, такие как: *M1447*, *M0244* и *M4215*, а также *M2237*, который является единственным не действительным для особей этого вида. Редкость вида *L. conocephalus* привлекла внимание, поскольку эта популяция имеет очень ограниченный ареал распространения в географическом контексте Арало-Сырдарьинского бассейна на территории Казахстана. Помимо высыхания Аральского моря и эрозии, которой подверглась эта часть бассейна, необходимо принять меры по сохранению, чтобы предотвратить негативное влияние, которые поставят под угрозу сохранение этих двух видов *Luciobarbus*.

3.4.6 Оценка естественной гибридизации среди особей

Установление фактов естественной гибридизации требует проведения генетического и статистического анализа особей из природы [282], до проведения подобных исследований, как правило, мы не можем говорить о факте гибридизации, а лишь предполагать по морфометрическим характеристикам [103; 273]. К примеру, в трибе *Barbini*, род *Capoeta* находится внутри тетраплоида *Luciobarbus* на митохондриальном древе, событие гексаплоидизации *Capoeta* может быть связано с древней гибридизацией между видами *Luciobarbus* в качестве материнского [161] и *Cyprinion* отцовского источника [283]. Естественная гибридизация может быть механизмом обмена генетическими ресурсами видов с целью и возможным результатом повышения приспособленности.

Была проведена оценка (таблица 9) гибридного индекса среди всех генотипов особей на основе 15 микросателлитных локусов:

Предполагаемые гибриды: из группы (pop) 4 - Рисовые чеки;
 Референсная популяция: группа (pop) 1 - с. Байыркум;
 Альтернативная популяция: группа (pop) 5 - р. Бадам;

Таблица 9 - Оценка гибридного индекса по Бюркле

№ особи	Точка отбора проб	h	In(likelihood) вероятность, %
At30350	с. Байыркум	0.1	47
At30352	с. Байыркум	0.0	38
At30353	с. Байыркум	0.0	58
At30421	Рисовые чеки	0.1	57
At30428	Рисовые чеки	0.0	49

Значения h , близкие к единице, указывают на близость к референтной; к нулю к альтернативной популяции, что подтверждает наличие генотипа обоих видов у представленных особей.

Согласно полученным данным функции правдоподобия $\ln(\text{likelihood})$ от 38-58%, где от 38 до 49% имеет значение «менее вероятно, чем нет», а где 57-58% «скорее вероятно, чем нет».

Изученные виды морфологически сходны и различить их достаточно сложно. При совпадении ареалов основанием для их разделения является экология среды обитания и образ жизни (мигрирующие и жилые формы). То, что они предположительно образуют помеси, отмечено и в книге «Рыбы Казахстана» [103], что, наконец, подтверждается проведённым генетическим анализом в данной работе, наличием в пределах ареала некоторых особей *L. brachycephalus*, несущих ядерный генотип *L. conocephalus*.

Представленные микросателлитные локусы в данной работе были амплифицированы как у аральского, так и у туркестанского усаца, что указывает этап консервативного типа эволюции [187] между этими двумя видами. Консервативный тип эволюции можно представить как состояние, а иногда даже как стадию существования вида или популяции, при котором территориальное постоянство обитания особей начинает преобладать над их подвижностью. В этих случаях, даже при широком распространении и достаточно высокой численности особей, вид обычно не бывает в состоянии быстро заселять новые пространства или восстанавливаться на тех участках ареала, на которых он почему-либо исчез [284].

Ядерные маркеры, проанализированные в этом исследовании, представляют собой первые микросателлиты, выделенные для *Luciobarbus*, и увеличивают доступные молекулярные ресурсы для этих тетраплоидных видов и могут внести вклад в популяционную генетику, а также важны для принятия соответствующих решений по дальнейшему сохранению.

3.5 Результаты применения митохондриального гена *Cytb*

3.5.1 Внутривидовое генетическое разнообразие аральского усача по результатам митохондриального гена *Cytb*

Секвенирование полного митохондриального гена *Cytb* (1141 п.н.) проводилось для всех особей усачей из 5 изученных точек отбора, было получено 96 секвенированных нуклеотидных последовательностей (Приложение В. рис.В.1-В.14). Анализ внутривидового генетического разнообразия проводился для 4 изученных точек поимки аральского усача, поскольку было недостаточно данных по популяции туркестанского усача, принадлежащей р. Бадам. На рисунке 17 представлен обзор консенсусной идентичности выровненных последовательностей собственных образцов (аральский усач представлен с G02 - G07) и с базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2.2 (Приложение В. рис.В.15-В.21).

	Consensus	TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.02. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.08. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.03. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.09. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.04. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.10. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.05. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.11. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.06. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.12. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.01. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.07. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.02. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.08. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.03. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.09. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.04. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.10. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.05. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.06. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
H.12. <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.01. <i>B.conocephalus</i>		TACCAGTAGAGCACCCTTATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
G.07. <i>B.conocephalus</i>		TACCAGTAGAGCACCCTTATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
AY004729.1 <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
AY004730.1 <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
AF095603.1 <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
KY457952.1 <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
KP712167.1 <i>B.brachycephalus</i>		TACCAGTAGAACATCCCTTCATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
AF145940.1 <i>B.capito</i>		TACCAGTAGAACACCCTTATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
AF045975.1 <i>B.capito</i>		TACCAGTAGAACACCCTTATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080
KP712171.1 <i>B.capito</i> / <i>B.conocephalus</i>		TACCAGTAGAGCACCCTTATCATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCCTATACTTTGCAC	1080

Рисунок 17 – Обзор консенсусной идентичности выровненных последовательностей собственных образцов в сравнении данных с базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2.2

Для проверки амплификации ПЦР продукта с праймером *Cytb* были получены изображения электрофоретического геля (рисунок 18).

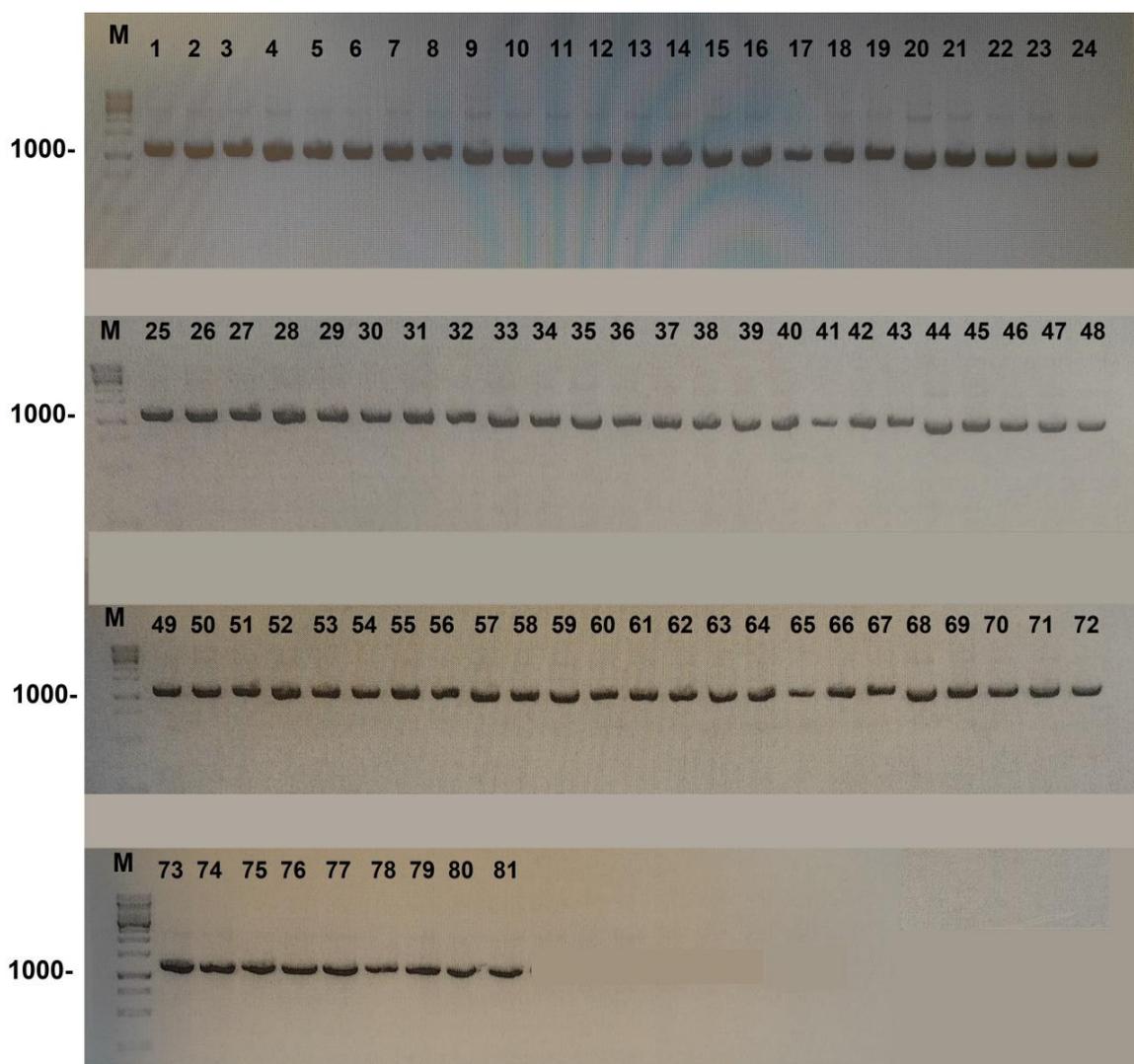


Рисунок 18 – Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле ПЦР - продуктов с праймером *Cytb* в реакции; М – стандартный маркер длин фрагментов с шагом в 250 п.н. (от 250 до 10000 п.н.) 1 kb DNA Ladder

Согласно полученному результату электрофоретического разделения в агарозном геле продуктов ПЦР с праймером *Cytb* длины фрагментов подтвердились в 1000 п.н.

В свою очередь, для всех образцов аральского усача, принадлежащих к единому бассейну Арал-Сырдарья, было высчитано внутривидовое нуклеотидное и гаплотипное разнообразие. При подсчете индексов генетического разнообразия, всего выявилось 19 гаплотипов (таблица 10).

Таблица 10 - Индексы генетического разнообразия

N_h	H_d	N_s	N_k	π	SD
19	0,879	19	2,22126	0,00199	0,033

Нуклеотидное разнообразие составило $\pi=0,00199$, индекс разнообразия гаплотипов приравнивается к 0,879, 19 полиморфных сайтов, среднее

количество различий между нуклеотидными последовательностями - 2,22126 и стандартное отклонение - 0,033.

Из общего количества сайтов 1116,00, была высчитана доля гуанина и цитозина (GC-состав) и данный показатель составил 0,448. Была определена эволюционная модель TN+F+I, которая лучше всего соответствует данным, с помощью информационного критерия Акаике (AIC).

Для лучшего понимания филогеографии аральского усача *L. brachycephalus* сконструирована сеть гаплотипов на основе собственных данных. Полученные гаплотипы аральского усача представлены на рисунке 19.

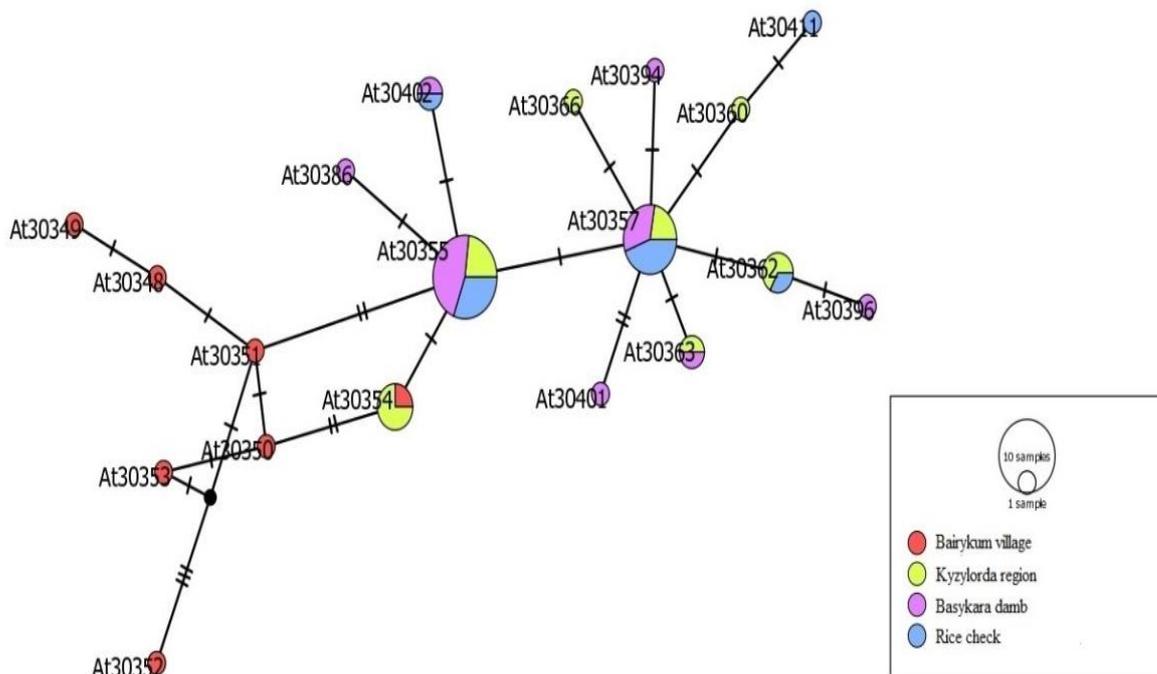


Рисунок 19 - Сеть гаплотипов вида *L. brachycephalus* по данным *Cytb* мтДНК по алгоритму Median-joining. В легенду включены образцы из точек отбора в пределах Арал-Сырдарьинского бассейна

Число штрихов на отрезках, соединяющих гаплотипы, соответствуют числу нуклеотидных замен, которые варьируют от 1 до 3, черная точка обозначает гипотетические гаплотипы. Обнаружено 2 центральных гаплотипа состоящих из генотипов особей из трех точек (близ г. Кызылорда, Басыкара, рисовые чеки), которые составляют смешанную группу репродуктивных особей в пределах своего ареала. Отдельный гаплотип составляют особи из участка близ г. Кызылорда и Байыркум, что вероятно свидетельствует о том, что особи мигрируют и обмениваются генетическим материалом, таким образом,

происходит поток генов между популяциями. Известно что, миграция в популяцию или из нее может изменить частоту аллелей, а также внести генетическую изменчивость в популяцию.

Четкую дистанцию и изолированную группу особей по гаплотипам представляют особи из точки Байыркума (Туркестанская область), гаплотипы которых не обнаруживаются у точки Басыкара и рисовых чеков. Как правило, препятствуют расстоянию и барьеры для размножения между двумя отдаленными популяциями, к примеру, многочисленные гидросооружения по всему течению р. Сырдарья.

Таким образом, можно утверждать что *L. brachycephalus* имеет высокое генетическое внутривидовое разнообразие.

Филогенетический анализ по Байесу и методу максимального правдоподобия для гена *Cytb* подтвердил наличие четырёх основных филогрупп среди проанализированных особей *L.brachycephalus* (рисунок 20).

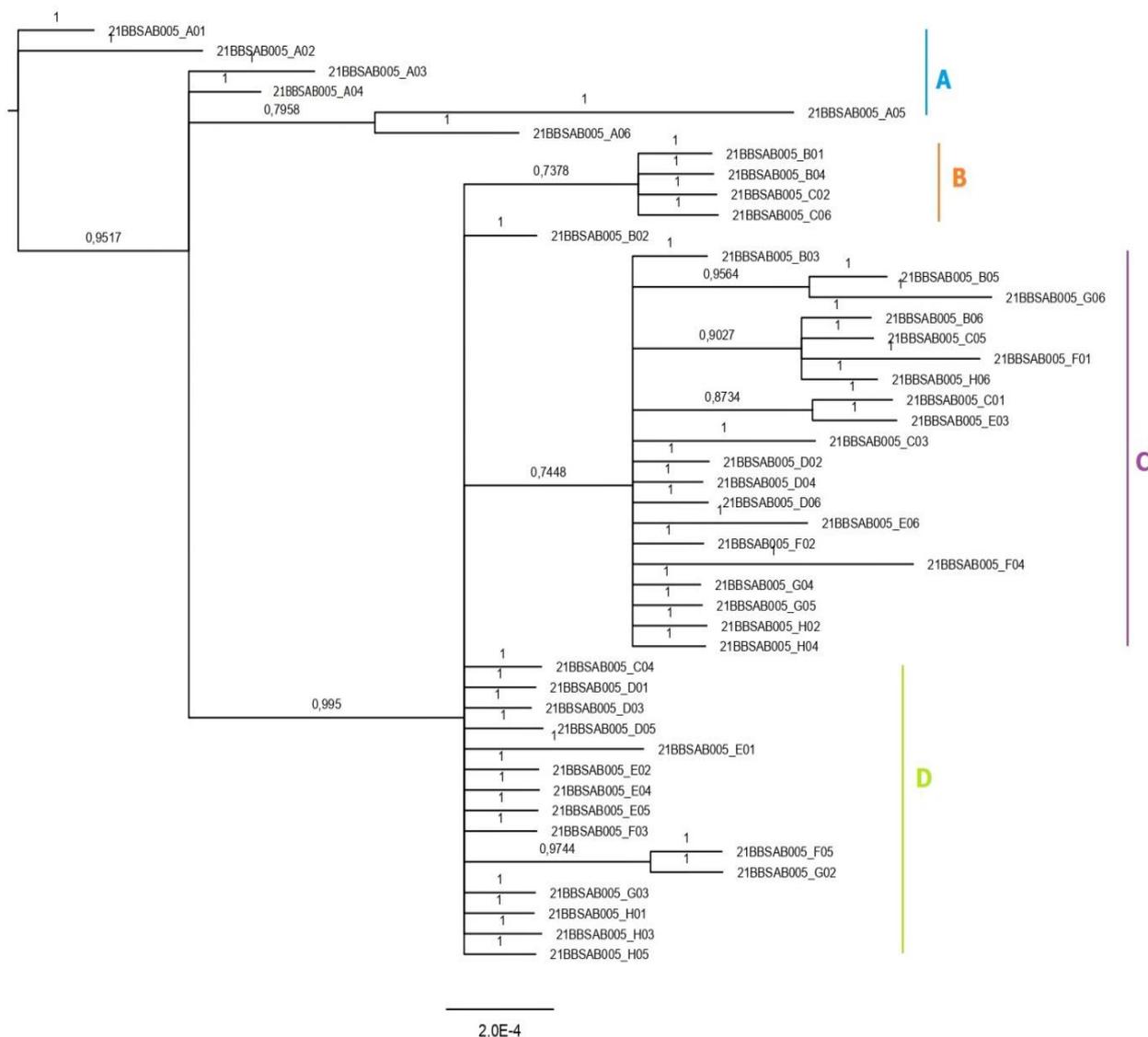


Рисунок 20 – Внутривидовое филогенетическое дерево гена *Cytb*, полученное с помощью байесовского вывода (BI)

Числа на ветвях обозначают значения апостериорной вероятности для VI, а под ветвями указывают бутстреп для максимального правдоподобия (Maximum likelihood).

Филогруппа А, соответствующая набору гаплотипов, уникальных для участка реки Сырдарья близ населенного пункта Байыркум; филогруппа В для особей близ г. Кызылорда; особи в филогруппе С и D охватывают большую часть ареала *L.brachycephalus* из участка плотины Басыкара и рисовых чеков (Кармакшинский район).

Проанализировав тесты на нейтральность получили следующие значения для теста Tajima's D: -1,56143, статистическая значимость: незначительно, $P > 0.10$, результаты статистики Fu's Fs: -12,552. Отрицательное значение Таджимы D, означает превышение низкочастотных полиморфизмов по сравнению с ожидаемым, что указывает на увеличение размера популяции или положительный отбор. Отрицательное значение Fs свидетельствует об избыточном количестве аллелей, как и следовало ожидать в результате недавнего расширения популяции или генетического автостопа. Стоит отметить, что генетический автостоп, так и фоновый отбор являются стохастическими (случайными) эволюционными силами, подобными генетическому дрейфу.

3.5.2 Филогенетический анализ рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 с помощью митохондриального гена *Cytb*

В водоемах Арало-Сырдарьинского бассейна встречаются два вида усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843; аральский усач *Luciobarbus brachycephalus* (Kessler, 1872) и туркестанский усач (ранее *Barbus capito conocephalus* Kessler, 1872) подвид усача булат-маи *Luciobarbus capito* (Güldenstädt 1773), принадлежащие к понто-каспийской пресноводной фауне [285; 286] и имеющие во многом совпадающие ареалы распространения [30;107]. Аральский усач *L. brachycephalus* представлен двумя популяциями. Первый распространен в бассейне Каспийского моря, второй представлен в бассейне Аральского моря. Туркестанский усач *L.capito conocephalus* распространен в водах бассейна Аральского моря, но, в отличие от аральского усача, является типично пресноводным организмом, не совершающим дальних миграций. Встречается преимущественно на равнинных участках рек Амударья, Сырдарья, Зеравшан, Кафирниган, Кашкадарья, Чу, а также в водохранилищах этих рек, в пойменных озерах, магистральных и сбросных каналах ирригационных систем [74; 118;119; 287-291]. Казахская часть ареала включает бассейн Сырдарьи от Шардаринского водохранилища до нижнего течения, включая бассейны рек, стекающих с юго-западных склонов хребта Каратау (реки Арысь, Бугун, Бадам, Келес) [103]. В каталоге рыб Эшмейера [26] был действительный подвид *L. capito conocephalus* Kessler 1872 со ссылкой на Берга Л.С [74]. Таксономический статус *L. capito conocephalus* вызывает споры. Берг Л.С. [289] отнес туркестанского усача к *Luciobarbus capito* как подвид, Коад Б.В. [292], Банареску П.М. и Богуцкая Н.Г. [293]

считали синонимом *L. capito*. В сводке «Рыбы Казахстана», 1988 г. [103], авторы отмечают, что подвид *Barbus capito conocephalus* (*L. capito conocephalus*) возможно правильнее рассматривать как подвид *Barbus brachycephalus*, то есть, *L. brachycephalus*. Для полного представления, схема показана на рисунке 21.

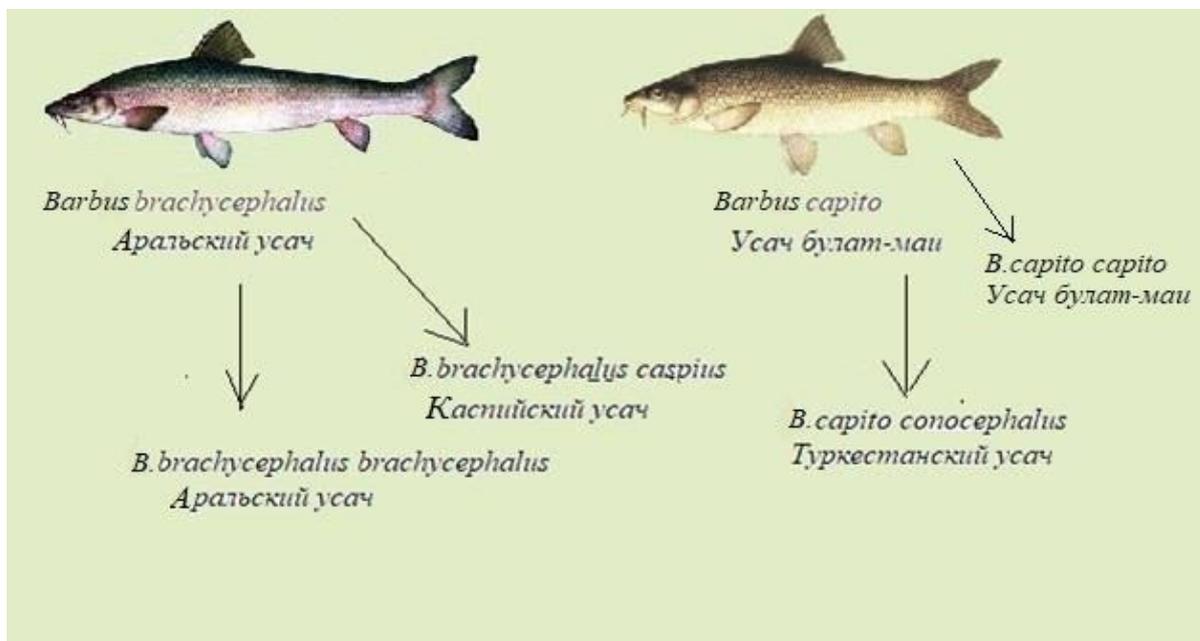


Рисунок 21 - Схематическое представление разделение усачей согласно сводке «Рыбы Казахстана», 1988 г. [103], (составлен автором диссертации)

Коллектив авторов третьего тома вышеназванной сводки Митрофанов В.П. и др., заключают что последнее можно доказать для бассейна Аральского моря, но совпадающий ареал этих видов в бассейне Каспия, заставляет их пересматривать их систематику в более широком плане, для чего у них нет достаточного материала, как отмечают авторы.

По последним данным Джоуладе-Роудбара и др. [294; 295], молекулярные и морфологические исследования подтверждают, что *L. conocephalus* является полноценным и действительным видом, он был обнаружен в р. Хари (Харируд) протекающая на территории Афганистана, Ирана и Туркменистана. Другие авторы как Эагдери С. и др. [296], Чичек Е., Фрике Р. [297], также указывают *L. conocephalus* как отдельный вид. В работе Джоуладе-Роудбара и др. [295], авторы указывают, что помимо экземпляров из р. Хари также синтипы из реки Зеравшан (Узбекистан). В этом исследовании автор следует более недавнему подходу Джоуладе-Роудбара и др. [295] и рассматривает туркестанского усача как *L. conocephalus*, а также согласно полученным данным молекулярного генетического анализа при исследовании гена *Cytb* мтДНК в настоящей диссертационной работе.

В таблице 11 представлен список видов, места отбора проб, инвентарные номера в GenBank и последовательности *Cytb* мтДНК собственных

(полученные результаты приведены в приложении Г. табл Г.1-Г.6) изученных особей и сравнительных материалов.

Таблица 11 - Название вида, места отбора проб и инвентарные номера в GenBank.

Вид	Водоем, страна / источник	Номер пробы или инвентарные номера в GenBank.
<i>L.brachycephalus</i>	р. Сырдарья, Казахстан	21BBSAB005_E01*
<i>L.brachycephalus</i>	р. Сырдарья, Казахстан	21BBSAB005_F05*
<i>L.brachycephalus</i>	р. Сырдарья, Казахстан	21BBSAB005_E02*
<i>L.brachycephalus</i>	р. Терек, Россия	AF095603
<i>L.brachycephalus</i>	р. Терек, Россия	AY004729
<i>L.brachycephalus</i>	р. Терек, Россия	KY457952
<i>L.brachycephalus</i>	р. Терек, Россия	AY004730
<i>L.brachycephalus</i>	Yang L., Sado T., et al [151]	KP712167
<i>L.brachycephalus</i>	р. Сырдарья, Казахстан	21BBSAB005_F01*
<i>L.capito</i>	р. Терек, Россия	AF045975
<i>L.capito</i>	Tsigenopoulos C.S., et al [76]	AF145940
<i>L.conocephalus</i>	р. Хари, Иран	MZ063684
<i>L.conocephalus</i>	р. Бадам, Казахстан	21BBSAB005_F06*
<i>L.conocephalus</i>	р. Бадам, Казахстан	21BBSAB005_G01*
<i>L.capito</i>	Yang L., Sado T., et al [151]	KP712171
<i>Cyprinus carpio</i>		AY347287

Полученные последовательности в этом исследовании отмечены *

Секвенирование полного митохондриального гена *Cytb* размером 1141 п.н. был получен для аральского и туркестанского усачей из реки Сырдарья и Бадам. Анализ полученных последовательностей выявил отличие в их нуклеотидных составах. Для построения филогенетического дерева были отобраны все образцы из GenBank по три вида из рода *Luciobarbus*. Филогенетическое дерево аральского усача *L.brachycephalus*, усача булат-май *L.capito* и туркестанского усача *L.conocephalus* построенное методом NJ (Neighbor-Joining) на основании последовательностей *Cytb* мтДНК, *Cyprinus carpio* был выбран в качестве внешней группы (outgroup).

Программой автоматически выбрано оптимальное дерево. Под ветвями показан процент повторных деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстрап-тесте (1000 повторов). Дерево нарисовано в масштабе, с длиной ветвей (рядом с ветвями) в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для построения филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального полного правдоподобия (Maximum likelihood) и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Этот анализ включал 16

нуклеотидных последовательностей. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Всего в окончательном наборе данных было 1118 позиций. Образцы изученные автором промаркированы красным знаком. Масштабная линейка соответствует 0,02 нуклеотидных замен (рисунок 22).

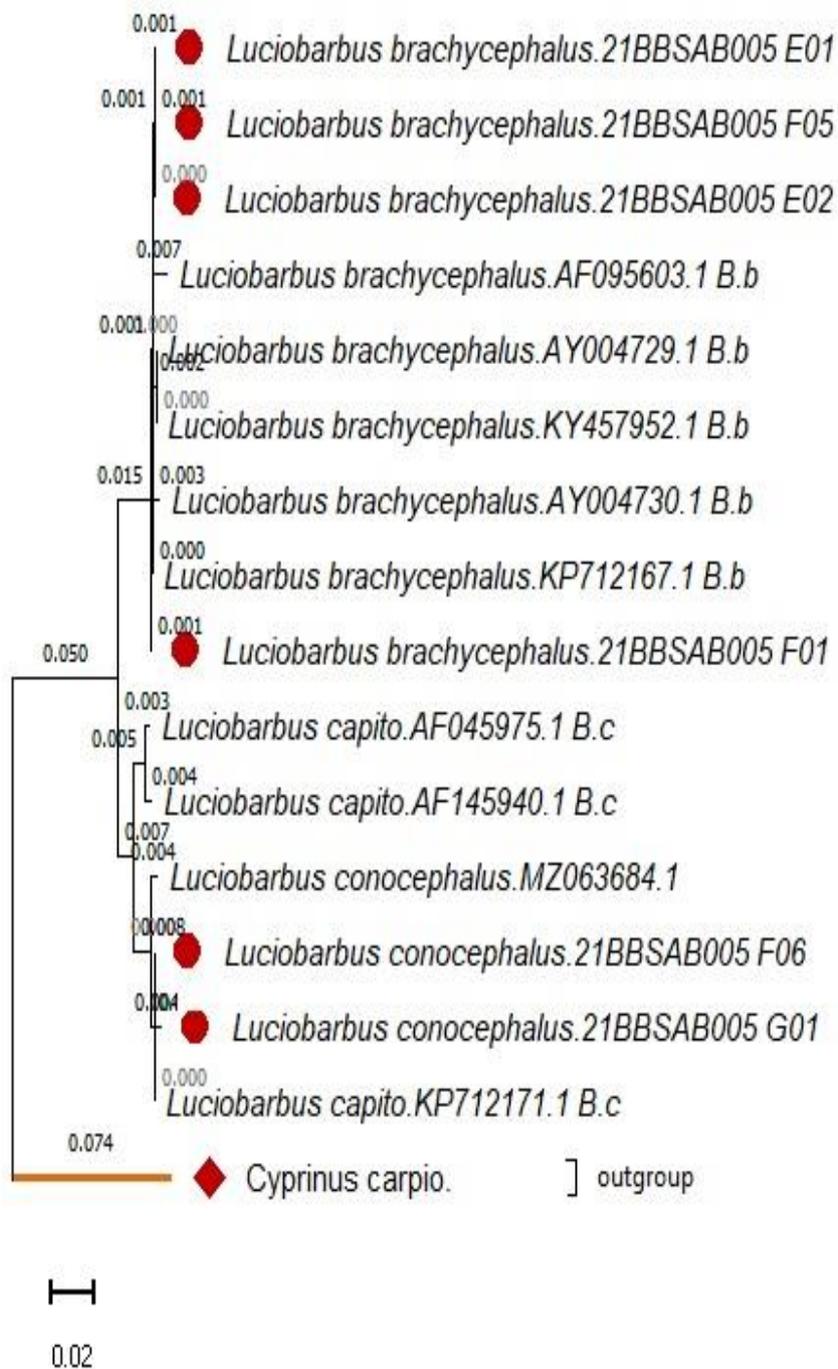


Рисунок 22 – Филогенетическое дерево некоторых видов усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 построенное методом NJ (Neighbor-Joining) на основании последовательностей *Cytb* мтДНК

На дереве присутствуют две большие клады, которые поддерживаются значениями апостериорной вероятности ($pp = 0,15$), одна из которых образована *L.brachycephalus*, а другая - клада с остальными изученными видами *L.capito* и *L.conocephalus*. В этой кладе виды *L.capito* и *L.conocephalus* оказались ближе, друг к другу, чем к *L.brachycephalus*.

Представленные в генбанке последовательности усача булат-маи *L.capito*, зарегистрированный под номером KP712171 (не указана локальность в GenBank и нет информации в статье) на филогенетическом дереве был сгруппирован отдельно и не образовал сходства с другими *L.capito* AF045975 из р.Терек (Россия) и образцом *L.capito* с инвентарным номером AF145940 (Tsigenopoulos C.S., et al., 2003 [76]), где также к сожалению не указана информация о водоеме.

По всей видимости, нуклеотидный состав усача булат-маи *L.capito* с инвентарным номером KP712171 (Yang L., Sado T., et al., 2015 [151]) в GenBank зарегистрированного как *L.capito* идентичен с *L.conocephalus*, так как данный образец присоединился к туркестанскому усачу *L.conocephalus* из р. Хари MZ063684 и к экзеплярам туркестанских усачей из р. Бадам (21BBSAB005_F06, 21BBSAB005_G01) изученным автором диссертации. Выяснение видовой принадлежности туркестанского усача *L.conocephalus* иными молекулярно-генетическими методами может являться дальнейшей задачей будущих исследований.

3.6 Результаты применения митохондриального гена *COI*

При исследовании митохондриального гена *COI* [298], полученные последовательности (прямая и обратная) были соотнесены друг к другу для подтверждения точности прочтения ДНК каждого образца. Установление видовой принадлежности усачей проведено методом сравнения полученной последовательности с референтными эталонными последовательностями различных видов рыб, депонированными в международной базе данных BoldSystems [299] с использованием алгоритма BLAST.

После сборки последовательности и консенсусного редактирования длина чтения последовательности составляла в среднем 585 пар оснований. База данных выявила максимальные совпадения идентичности 99% последовательностей гена *COI*, принадлежащих роду *Luciobarbus*. Полученные последовательности *L.brachycephalus* было больше совпадений с *L.brachycephalus*.

Стоит отметить, что принадлежность исследуемых образцов аральского усача как *Luciobarbus brachycephalus* с точностью совпадения нуклеотидной последовательности составило 99,86 %, данный результат был необходим для подтверждения принадлежности сформированного ремонтно-маточного стада аральского усача содержащихся в рыбопитомнике Казахстана.

3.7 Результаты применения микросателлитных локусов для генетической паспортизации усачей

Учитывая скудность генетических данных для находящихся под угрозой исчезновения усачей, критериями отбора локусов, помимо появления продукта ПЦР, были и размер продуктов амплификации, пригодный для анализа в полиакриламидном геле. Размеры ПЦР-продуктов исследованных локусов колебались от 100 до 248 п.н. Для генетической паспортизации были использованы микросателлитные локусы с модифицированным 5'-концом флуоресцентными метками R6G (зеленый), ROX (красный), FAM (синий), HEX (пурпурный), TAMRA (желтый), в таблице 12 также приведены генетические данные: название локуса, последовательности праймеров и другие характеристики.

Таблица 12- Генетическая характеристика микросателлитных локусов для аральского усача

Наименование локуса	Прямой и обратный последовательности (5'-3')	Т° отжига	Размер ампликона	Флуоресцентный маркер	Повторяющийся мотив
<i>Barb37</i>	F:AAATACGCTCTCCTCATTAC R:GTACAAAAGCAAAAATAAATTA	50	155-164	R6G	GATA
<i>Barb54</i>	F:GTTGTTTTGATTACACTGAG R:TACCATCTGCTGCTGCTTC	58	-	FAM	ATTT
<i>Barb59</i>	F:CTGTATCCATCACATAGGCT R:CATGATTTAATAGAACACACAC	56	-	TAMRA	GATA
<i>Barb79</i>	F:GAGTGAATCATTACATCCCT R:GCTTTTCTTGATTTAGTATTT	46	164-176	ROX	CA
<i>BC8</i>	F:ATGGCAGGAGAAACGATCAC R:GGTTCTACCCGCTCTTACCC	56	185–194	HEX	(AC) ⁷
<i>BC17</i>	F:GCAGGGTGGAGTTGGAGTAG R:GAGAGTGTGCTGGCATGTGT	58	164–176	R6G	(AC) ¹¹
<i>BC26</i>	F:CATCATCACACAGCAGCA R:TTCAGTCCGTCGTCTCGTCT	58	221–248	FAM	(CGA) ⁵
<i>BC37</i>	F:CGGCCTGTGAGTGTGTGTAT R:GACGATCACATACGCCTTCA	56	238–246	TAMRA	(TG) ¹⁶
<i>BC42</i>	F:AAAGAGCAGCGGACGAATAA R:CGTCCAGAGGAACGGTTTAG	54	108–115	ROX	(TC) ²⁴
<i>BC47</i>	F:TTTGGGTTTTGAGGGCTATG R:CCTTTGCTTCACCAGATACG	54	190–225	HEX	(TA) ³ , (TCAT) ⁷

Отрицательный результат был выявлен в локусах: *BC17*, *BC26*, *BC42*, *BC47*, *Barb54*, *Barb59*, соответственно они были исключены [300]. Критериям отбора наиболее соответствовали локусы *Barb37*, *Barb79*, *BC8*, *BC37* [301]. Аллельное разнообразие аральского усача по 10 STR локусам представлено в таблице 13.

Таблица 13 - Аллельное разнообразие аральского усача по 10 STR локусам

Микросателлитный локус	Число аллелей на выборку
<i>Barb37</i>	5
<i>Barb54</i>	исключен
<i>Barb59</i>	исключен
<i>Barb79</i>	3
<i>BC8</i>	4
<i>BC17</i>	исключен
<i>BC26</i>	исключен
<i>BC37</i>	3
<i>BC42</i>	исключен
<i>BC47</i>	исключен

3.7.1 Аллельное разнообразие аральского усача по отобраннным локусам

Аллельное разнообразие аральского усача по отобраннным локусам и число аллелей на выборку представлено на рисунке 23.

Barb37
 Barb79
 BC8
 BC37

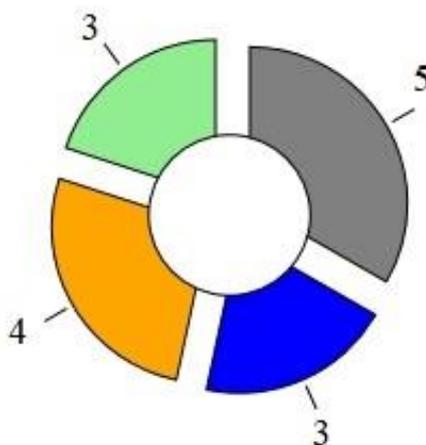


Рисунок 23 - Аллельное разнообразие аральского усача по отобраннным локусам *Barb37*, *Barb79*, *BC8*, *BC37*

У всех проанализированных особей ремонтно-маточного стада, потенциальных производителей аральского усача, содержащихся в рыбопитомнике, впервые по четырем исследованным локусам выявлено 14 аллелей. Число аллелей на локус составляло 3 (*Barb79*; *BC37*); 4 (*BC8*) и 5 (*Barb37*), в среднем значении 3,75. Наименее полиморфным в выборке оказался локус *Barb79* и *BC37* с размерным диапазоном 164–176 и 238–246 п. н. Результаты исследования геномной ДНК у усача выявили преобладание в локусе *Barb37* аллеля 155 п. н. (70 %) как показано на рисунке 24.

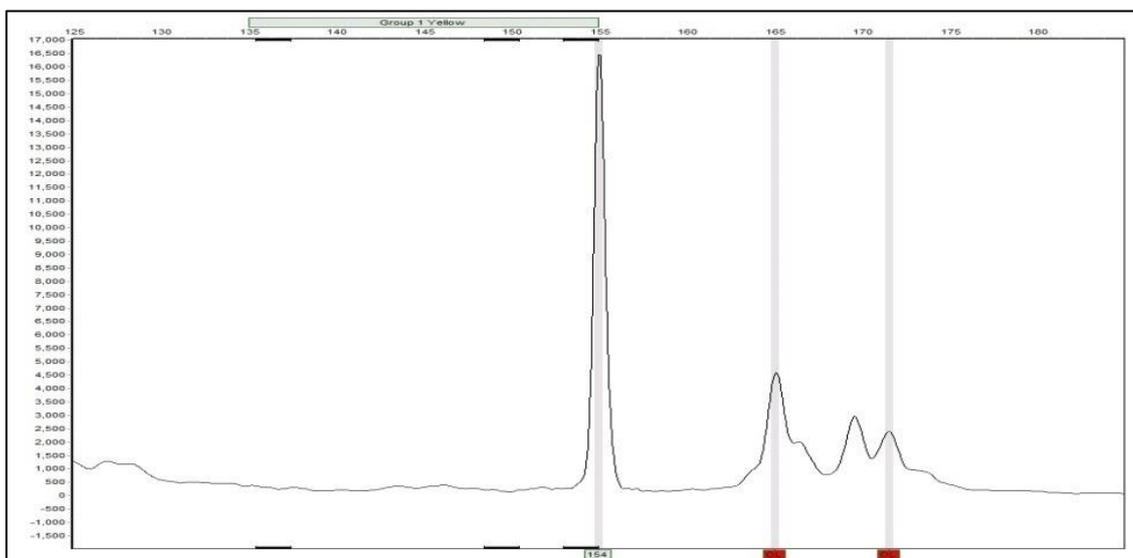


Рисунок 24 - Генотип аральского усача, где представлен участок локуса *Barb 37*

Наибольший полиморфизм проявили локусы *Barb37* и *BC8* с размерными диапазонами аллелей 155–164 и 185–194 п. н. соответственно. Примененные микросателлиты для генетической паспортизации удобны в использовании, а также синтез данных микросателлитов производится относительно быстро и доступно.

3.7.2 Генетическая паспортизация ремонтно-маточного стада аральского усача *L. brachycephalus*

В связи с тем, воспроизводство ценных видов рыб является единственным способом их сохранения, разработка генетических маркеров становится особенно актуальной. Генетический паспорт - содержит информацию о виде и индивидуальные генетические данные - митохондриальный гаплотип и аллельный состав по всей панели микросателлитных локусов, используемых для генетической паспортизации.

Проведена апробация микросателлитных (STR) локусов и некоторые из них рекомендованы в методической рекомендации (Приложение Д., рис. Д.2.) для генетической паспортизации производителей, отобранных для формирования РМС аральского усача.

Для генетической паспортизации (Рисунок 25) были учтены пятнадцать особей, потенциальных производителей аральского усача выловленных из естественной среды, а именно из реки Сырдарья.

Молекулярно-генетический масспаспорт выборки			
аральского усача (<i>Luciobarbus brachycephalus</i>) из РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник». Анализ выполнен с использованием объединенной выборки биопсийных материалов особей аральского усача по мтДНК и 4 микросателлитным локусам: (<i>Barb37, Barb79, BC8, BC37</i>)			
Название локуса	Диапазон размеров аллелей для данного вида	Кол-во аллелей в данной выборке	Размер аллеля (пара нуклеотидов) встречаемость в выборке (%)
<i>Barb37</i>	182-186 п.н	5	182 (0,253), 186(0,335)
<i>Barb79</i>	164-168 п.н.	3	164 (0,235), 168 (0,135)
<i>BC8</i>	184–188 п.н.	4	184 (0,233), 188 (0,297)
<i>BC37</i>	236–240 п.н.	3	236 (0,210), 240 (0,175)
Митохондриальны й гаплотип	(5'TGCCTTAAGCCTTCTCATTCGAGCCGAATTAAGTCAACCCGGA TCCCTTCTAGGTGATGATCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCTC ACGCCTTCGTGATAATCTTCTTTATAGTAATGCCTATTCTAATTGG AGGATTTGGGAACCTGACTTGTGCCATTAATAATTGGAGCCCCAGA CATAGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGTTTCTGACTACTGCC CCCATCATTCCCTGCTACTACTAGCCTCTTCTGGTGTGGAAGCTGGA GCCGGGACAGGATGAACAGTGTATCCGCCCTCTCAGGAAACCT GGCCCACGCAGGGGCATCAGTAGACCTAACAATCTTCTCGCTACA CCTAGCAGGTGTTTCATCAATCCTGGGGGCAATCAATTTTATCAC TACAACSTATTAAACATAAAACCCCCAGCCATTTCCCAGTATCAAAC ACCCSTATTTCGTCTGATCCGTGCTCGTAACCGCCGTATTACTTCTC СТАТCACTACCCGTCCSTAGCCGCCGGAATTACAATACTCСТААСА GACCGAAACCTTAAACACCACATTCTTTGACCCCGCTGGGGGAGGA GACCSAATCCTCTACCAACACSTATTCTGATTCTTTGGTCACCCAG AAGTATATATCCTTATCCTTCCAGGGTTTGAATTATTTCTCACGT CGTAGCCTACTA-3')		

Рисунок 25 - Молекулярно-генетический масспаспорт выборки аральского усача *L.brachycephalus*

Образцы (ткани) особей хранятся в лаборатории генетики гидробионтов («Научно-производственный центр рыбного хозяйства»). Генетический паспорт ремонтно-маточного стада аральского усача находится в «РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник», также был получен акт внедрения научных результатов исследований (Приложение Д. рис.Д.1).

Разноплановые комплексные молекулярно-генетические исследования необходимы для сохранения генофонда и развития аквакультуры и доказывают необходимость их использования на рыбоводных заводах Арало-Сырдарьинского бассейна.

Сохранение генофондов видов, при этом, играет важнейшую роль для их долговременного существования, а долговременный устойчивый промысел невозможен без определения единиц запаса, границ популяций и должен базироваться на популяционно-генетических данных.

3.7.3 Необходимость генетического мониторинга при формировании ремонтно-маточного стада аральского усача в промышленных условиях

Создание ремонтно-маточных стад редких и эндемичных видов рыб - одна из основных мер по сохранению биоразнообразия. Наличие ремонтно-маточных стад видов рыб, относящихся к категориям редких, находящихся под угрозой исчезновения и эндемичных, будет в дальнейшем способствовать разработке и совершенствованию биотехнических приемов их разведения и выращивания жизнестойкого рыбопосадочного материала для зарыбления водоемов.

Разработка технологий искусственного воспроизводства и формирования РМС в промышленных условиях направлена на решение фундаментальной и прикладной проблемы, связанной не только с увеличением производства рыбной продукции, но и для сохранения биологического разнообразия и рационального использования потенциала природных популяций.

Запасы ценной промысловой рыбы - аральского усача в р. Сырдарья и Аральского (Малого) моря в настоящее время катастрофически снижены в результате антропогенного воздействия на ихтиофауну Приаралья. Отлов молоди усача в коллекторах оросительных сетей Кызылординской области и выпуск ее в естественные водоемы не обеспечивает восстановления численности природных популяций, коэффициент промыслового возврата от выпуска такой молоди ничтожно мал. В связи с этим есть необходимость в зарыблении водоемов более крупной молодью, способной быстро выйти из-под пресса хищных рыб и способствовать образованию локальных популяций, способных обеспечить восстановление численности рыб. Исследования по биотехнике разведения усача с последующей акклиматизацией и реакклиматизацией этого вида рыб позволят не только качественно улучшить состав ихтиофауны водоемов Приаралья, но и сохранить генетический потенциал природных популяций. В дальнейшем, сформированные маточные стада усача будут использованы для получения потомства и проведения работ по их искусственному воспроизводству [302].

При методе, где отбор лучшего потомства усача из посадочного материала по установленным критериям с последующим выращиванием производителей до половозрелого состояния. Этот метод более трудоемкий и длительный. Он предусматривает отбор лучших ремонтных особей на всем протяжении выращивания при помощи оценки экстерьерных и рыбоводных показателей. Несомненным достоинством этого метода является то, что вся рыба хорошо приспособлена к условиям содержания, искусственному кормлению. К недостаткам следует отнести большую вероятность близкородственного скрещивания вследствие ограниченного исходного производителей и длительный период содержания до первого получения половых продуктов 6-8 лет. Несмотря на сложность этого метода, при котором затрачиваются большие усилия на уход, охрану, содержание и кормление РМС, положительным моментом является возможность сохранения природного генетического разнообразия.

Второй метод как одомашнивание диких производителей заключается в получении от них половых продуктов с дальнейшей адаптацией рыб к искусственным условиям содержания и последующим созреванием. При доместикации используются зрелые производители. Этот метод позволяет в 2-3 раза сократить сроки формирования РМС и обеспечить достаточную гетерогенность формируемого стада. Срок формирования маточного стада сокращается до минимума – 5-7 лет. При формировании РМС по этому принципу применяется метод селекции. Современные методы оценки физиологического состояния производителей и оценки их генетических характеристик позволяет более точно и направленно отобрать пары производителей с целью получения более жизнестойкого потомства. Метод одомашнивание производителей также имеет определенные нерешенные аспекты, так как большую сложность представляет адаптация рыб к содержанию в условиях рыбоводных хозяйств. При закладке племенного материала усача необходимо принимать меры, обеспечивающие сохранность исходного генетического разнообразия.

Для этого личинок для племенных целей необходимо отбирать не менее чем от 10-20 самок. Для оплодотворения икры каждой самки используют сперму не менее 3 самцов, отбирают икру с высоким процентом оплодотворения (не ниже 80%) и минимальным числом эмбрионов с отклонениями (2-3 %). При соблюдении таких правил увеличение уровня инбридинга за поколение будет минимальным.

Тем самым, для обеспечения оптимального уровня генетического разнообразия в условиях искусственного воспроизводства необходимо:

- сохранять определенный уровень численности производителей в маточных стадах в количестве: минимум 50, оптимум 200;
- при воспроизводстве каждого поколения обеспечить равный вклад представителей разного пола в нерестовую структуру стада (соотношение самцов и самок не более 1:1), что позволит уравнивать генетический вклад каждой особи в следующее поколение;

– обеспечить проведение эколого-генетического мониторинга племенного материала и, при необходимости, производить интродукцию рыб из природных популяций.

Неотъемлемой задачей при проведении научно-исследовательских работ по восстановлению редких и исчезающих рыб является изучение их генетической структуры, что вовсе не было изучено прежде. Для этого проводится оценка их генетической полиморфности, ведь в дальнейшем у производителей из РМС, как правило, в отличие от рыб из природной популяции, может наблюдаться дефицит гетерозигот, что может в дальнейшем неблагоприятно отразиться на качестве выпускаемой молодежи.

Использование принципов природоохранной генетики при составлении оптимальных пар скрещиваний позволяет исключить генетическое вырождение популяции из-за инбридинга (близкородственного скрещивания).

Система генетического мониторинга, то есть составление генетических паспортов для рыбоводных хозяйств позволяет оценить степень генетического родства особей, участвующих в получении половых продуктов с целью искусственного воспроизводства, а также в дальнейшем идентифицировать потомство, полученное от генотипированных производителей.

3.8 Вопрос сохранения естественных популяций усачей Арало-Сырдарьинского бассейна

Теоретически генетическая изменчивость важна для долгосрочного выживания вида. Генетическая изменчивость может гарантировать приспособленность вида или популяции путем предоставления виду или популяции способности адаптироваться к изменяющейся окружающей среде. Очевидно, что отсутствие генетической изменчивости или слишком высокая гомозиготность могут иметь пагубные последствия. В данной работе микросателлитная гетерозиготность использовалась как оценивающий индикатор индивидуальности.

Популяции, которые генетически дифференцированы, но, так же, имеют свободный доступ к нересту друг с другом, поскольку живут в одном и том же водоеме являются симпатрическими, к примеру, как данные объекты исследований. Репродуктивная изоляция среди симпатрических популяций происходит не из-за географических границ, таких как береговая линия озера, а из-за таких процессов, как ассортативное (неслучайный подбор пар) спаривание, обонятельное возвращение к натальным областям, физиологические процессы, основанные на различиях во времени нереста и поведенческий отбор различных нерестовых субстратов. Вдобавок, естественные популяции являются лучшей версией генных банков, и сохранение этих генофондов может дать возможность использовать эти генетические ресурсы необходимым образом в будущем.

Общеизвестно что, окружающая среда, климат и географическое положение оказывают большое влияние на генетическую изменчивость популяций [303]. Такие популяции в основном состоят из более

специализированных видов, которые например, имеют очень ограниченный географический ареал. Высыхание и загрязнение водоемов может также селективно влиять на генетическую изменчивость, наращивая изменчивость путем мутаций или разрушительного отбора, понижение изменчивости за счет дифференциальной смертности некоторых генотипов или за счет сокращения размеров популяции, что затем приведет к случайному генетическому дрейфу.

Можно отметить, что генетическая структура популяций усачей формируется из дифференцированных локальных популяций на отдельных участках водоема. Согласно результатам анализа митохондриальных маркеров ДНК, также можно предположить, что дивергенция групп популяций усачей вызвана малой численностью и ограниченной частотой миграций между группами (обусловленными природно-географическими условиями мест обитания и прочими факторами), а не долговременной изоляцией в современных местах обитания.

Гены, виды и экосистемы – три основных уровня разнообразия, определенных Международным Союзом Охраны Природы МСОП. Изучение каждого из этих уровней по отдельности поможет нам понять связанные процессы, формирующие мировое биоразнообразие, а в дальнейшем создать и цельный синтез знаний, полученных на разных уровнях исследования. Генетически дивергированные локальные популяции это четвертый уровень разнообразия, слагающие метапопуляционные системы видов, вероятно – самый значимый уровень для прикладывания усилий по сохранению биоразнообразия, интегрирующий, в себе основополагающие элементы вышеперечисленных трех уровней [304].

Сохранение системы многих, генетически различных локальных популяций и их структуры необходимо для долговременного выживания видов и функционирования экосистем.

Снижение генетического разнообразия [305] понижает способность популяции адаптироваться к будущим изменениям окружающей среды, например биотическим и абиотическим, снижая пластичность геномов популяций [306]. Необходимо отметить, что по уровню генетического разнообразия выделяются малые изолированные популяции, демонстрирующие следы деградации генофонда, в то время как большая часть исследованных особей имеет средний уровень генетического разнообразия. Следовательно, требуется интенсивная охрана вида и искусственное разведение для увеличения численности этого вида.

На сегодняшний день главными проблемами Арало-Сырдарьинского бассейна являются сокращение численности, уменьшение генетического разнообразия, угроза необратимой потери популяций редких и исчезающих рыб. В связи с резким снижением численности природных популяций будут постепенно внедряться технологии выращивания усачей в искусственных условиях и выпуск молоди в естественную среду обитания, что может привести к потере внутри- и межпопуляционного разнообразия и накоплению генетического груза.

Работы по реинтродукции и искусственному воспроизводству усачей должны учитывать особенности описанной генетической структуры популяций усачей во избежание деградации популяционных генофондов вида. Производители должны отбираться из того водоема, в котором планируется выпуск молоди. При невозможности отбора производителей из этого водоёма, они должны быть взяты из популяций того же зоогеографического региона, принадлежащих к одной генетической группе популяций.

Необходим генетический мониторинг усачей, искусственное разведение исчезающих популяций, охрана и восстановление мест обитания и воспроизводства с учетом последствий антропогенного воздействия на Арало-Сырдарьинский бассейн в ходе последних десятилетий.

Полученные и опубликованные результаты в настоящем диссертационном исследовании [274; 275; 281; 298; 300-302] по генетической структуре и филогенетической организации усачей Арало-Сырдарьинского бассейна послужат основой для дальнейших генетических и таксономических исследований, а также позволят принимать более адекватные решения в природоохранной сфере. Наследие этих исследований может оказать долгосрочное влияние на сферу ихтиологии и генетики.

Таким образом, использование ядерных и митохондриальных маркеров проливает свет на сложную картину эволюционной истории этого рода. С помощью комплексных молекулярно-генетических методов удалось решить данную научную проблему в области отечественной ихтиологии и внести существенный вклад в изучение генетического разнообразия усачей, которое было в неясности порядка 30 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплексный анализ усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна позволило сделать следующие выводы:

1. По результатам картирования мест обитания усачей в Арало-Сырдарьинском бассейне, территория выборки охватывала большую часть известного ареала распространения. Выяснено что основными местами скопления старшевозрастных особей усача в границах Кызылординской области является нижний участок плотины Басыкара. Полученные значения коэффициента вариации морфобиогических характеристик 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 выровненного в Clumpak, где оба вида разделяются на два кластера: один группирует популяции аральского усача (точки 1-4), а другой принадлежит популяциям вида туркестанского усача (точка сбора 5). 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 среди проанализированных особей. Обнаружено 2 центральных гаплотипа состоящих из генотипов особей из трех точек (близ г. Кызылорда, Басыкара, рисовые чеки), которые составляют смешанную группу репродуктивных особей в пределах своего ареала. Отдельный гаплотип составляют особи из участка близ г. Кызылорда и Байыркум, что вероятно свидетельствует о том, что особи мигрируют и обмениваются генетическим материалом. Четкую дистанцию и изолированную группу особей по гаплотипам представляют особи из точки Байыркума, гаплотипы которых не обнаруживаются у точки Басыкара и рисовых чеков. 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 исследованными 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. Образцы туркестанского усача из р. Бадам Арало-Сырдарьинского бассейна (21BBSAB005_F06, 21BBSAB005_G01) изученные автором, присоединились к туркестанскому усачу из р. Хари MZ063684. 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 предварительная апробация генетического паспорта ремонтно-маточного стада аральского усача *L. brachycephalus* содержащихся в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник». По четырём (*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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Xenarios, S.; Schmidt-Vogt, D.; Qadir, M.; Janusz-Pawletta, B.; Abdullaev, I. The Aral Sea Basin: Water for Sustainable Development in Central Asia; Routledge: Oxfordshire, UK, 2019.
- 2 Нургизаринов А.М., Назаров Е.А., Шарипова А.Ж., Арыстан Е.Ж. Роль Аралдарьи в поддержании уровня в разные периоды Аральского моря // Гидрометеорология и экология. №2. 2014. 185-193 с.
- 3 Горшков П.П., Якушова А.Ф. Общая геология. – М.: Изд. МГУ, 1962.
- 4 Бадюкова Е.Н. Соединение Аральского и Каспийского морей в конце плейстоцена — начале голоцена // VIII Щукинские чтения: Рельеф и природопользование. МГУ. 2020. 6 с.
- 5 Izadighalati S. The New Proof of Marine Connection of Red Sea with Mediterranean, Marmara, Black, Caspian and Aral Seas by Reviving The Lakes of Dead, Galilee, Tuz, Iznik, Van and Urmia//6th International Congress of Developing Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran. 1 p.
- 6 Satybaldiyev B., Ismailov B., Nurpeisov N., Kenges K., D. Snow D., et al. Downstream hydrochemistry and irrigation water quality of the Syr Darya, Aral Sea Basin, South Kazakhstan. Water Supply (2023) 23 (5): 2119–2134. <https://doi.org/10.2166/ws.2023.114>.
- 7 Reimov, P., Fayzieva, D. (2014). The Present State of the South Aral Sea Area. In: Micklin, P., Aladin, N., Plotnikov, I. (eds) The Aral Sea. Springer Earth System Sciences, vol 10178. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 8 Румянцев В.А., Драбкова В.Г., Измайлова А.В. Великие озера мира – СПб: Лема, 2012. – 370 с.
- 9 Добровольский А. Д., Залогин Б. С. Моря СССР. М., Изд-во МГУ, 1982 г. 192 с.
- 10 Anchita, Zhupankhan, A., Khaibullina, Z., Kabiyeu, Y., Persson, K. M., & Tussupova, K. (2021). Health impact of drying Aral Sea: One health and socio-economical approach. Water, 13(22) 1-21 p.
- 11 Бартольд В.(1964) - Сведения об Аральском море и низовьях Амударьи с древнейших времен до XVII века / Бартольд В.В. Сочинения. Т. III. М.: Наука, 1964. – 711с.
- 12 Берг Л.С. (1908) Аральское море. Опыт физико-географической монографии/ Издание «Известия Туркестанского отделения Императорского Русского Географического Общества». Санкт-Петербург: Тип. М.М. Стасюлевича, 1908. – 580с.
- 13 UNEP (1993) The Aral Sea. Diagnostic Study for the Development of an Action Plan for the Conservation of the Aral Sea. Nairobi, 1993. - 113p.
- 14 Кукса Б.И. (1994) Южные моря (Аральское, Каспийское, Азовское и Черное) в условиях антропогенного стресса. Санкт-Петербург: Гидрометеоиздат, 1994. – 317с.
- 15 Панкова Е.И. и др. (1996) Природное и антропогенное засоление бассейна Аральского моря / Панкова Е.И., Айдаров И.П., Ямнова И.А., Новикова А.Ф., Благоволин Н.С. М.: РАСХН. 1996.- 187 с.1996.- 187 с.

16 WB (1998) Aral Sea Basin Program (Kazakhstan, Kyrgyz Republic, Tajikistan, Turkmenistan and Uzbekistan) Water and Environmental Management Project. Project Document. Volume I – Main Report, May 1998. - 55p.

17 Завьялов П.О. и др.(2011) Аральское море в начале XXI века (физика, биология, химия). М.: Издательство «Наука».2011. - 252 с.

18 Завьялов П.О. и др. (2012). Большое Аральское море в начале 21 века: Физика, биология, химия. М.: Издательство «Наука». 2012.- 229 с.

19 Кипшакбаев Н.К. и др. (2010) Восстановление экологической системы в дельте Сырдарьи и северной части Аральского моря. Алматы: «ЭВЕРО», 2010. – 220 с.

20 Новикова Н.М. (2019) Эколого-географический аспект Аральского моря. Часть 1. Развитие Аральской проблемы, ее изучение, оценка и разработка мероприятий. Экосистемы: экология и динамика , 2019, том3, №1, с.5 - 66.

21 Новикова Н.М.(2020) Эколого-географический аспект Аральского моря. Часть 2. Исследование динамики климата и изменений обсохшего моря, Электронный научный журнал «Экосистемы: экология и динамика». 2020, том4, №2, с.96 - 170.

22 Панкова Е.И. (2016) Засоление орошаемых земель Среднеазиатского региона: старые и новые проблемы. М.: Аридные экосистемы, 2016, том 22, № 4 (69), с. 21-29.

23 Глазовский Н.Ф. (1990) Аральский кризис: Причины возникновения и пути выхода / Н. Ф. Глазовский; Отв. ред. Н.Т. Кузнецов; АН СССР, Ин-т географии, НИКЦ «Арал» ГКНТ и АН СССР. 1990. -134с.

24 Самарханов К., Исанова Г. Обзор географических и экологических исследований бассейна реки Сырдария и Аральского моря // Вестник КазНУ. Серия географическая. №3 (46) 2017. 49-57 с.

25 Достай Ж.Д., Алимкулов С.К., Сапарова А.А. Оценка водных ресурсов на современном этапе развития Арало-Сырдарьинского природно- хозяйственного комплекса // Гидрометеорология и экология. № 1. 2016. 93- 102 с.

26 Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & R. van der Laan (eds) 2023. Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. (Дата обращения: 20.06.2023 г.)

27 Pešić, A., Ikica, Z., Joksimović, A., Djurović, M., Laušević, R. (2018): Rare and Endangered Fish Species in the Adriatic Sea and Proposal for Marine Flagship Species. Kotor: University of Montenegro, Institute of Marine Biology. 49 pp.

28 Fisher J., Simon N., Vincent J. The red book: wildlife in danger. London: Collins Publishear, 1969. 368 p.

29 <https://www.iucnredlist.org> (Дата обращения: 20.06.2023 г.)

30 Красная книга Республики Казахстан / ред. Мелдебеков А.М. — 4-е. — Алматы, 2010. — Т. 1. Животные. Часть 1. Позвоночные.

31 Дукравец Г. М. Рыбообразные и рыбы в Красных Книгах МСОП и Республики Казахстан //Tethys aqua zoological research, volume I — Almaty: “Tethys”, 2002.—21-28 p.

- 32 Mamilov N.Sh., Karimov B.K., Jörg Freyhof. The status of native non-commercial fish of Central Asia // *Selevinia*. Т.29.2021. 137-138 p.
- 33 Тишков, А.А. Теория и практика сохранения биоразнообразия. К методологии охраны живой природы в России /А.А.Тишков //Экол. вестн. России, 2006. - №10. - С.9-12.
- 34 Алимов, А.Ф. Роль биологического разнообразия в экосистемах// Вестн. РАН. - 2006. - 76. - № 11. - С. 989-994.
- 35 Гецен М.В. Биоразнообразие экосистем Полярного Урала / -Сыктывкар, 2007. - 52 с.
- 36 Павлов Д.С., Захаров В.М. Изменение климата и биоразнообразие России / - М.: Акрополь, 2007. - 96 с.
- 37 Веснина, Л.В. Перспективы развития сиговодства в Алтайском крае // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. — Тюмень: Госрыбцентр, 2010. - С.205-207.
- 38 Костюничев, В.В. Нельма, как перспективный объект аквакультуры // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. - Тюмень, 2010. - Госрыбцентр. - С.215-218.
- 39 Михайлова, М.В. Искусственное воспроизводство рыбных запасов и его эффективность // Рыбное хоз-во, 2011. - № 3. - С. 76-78.
- 40 Петлина, А.П. Редкие и малочисленные виды рыб бассейна Нижней Оби // Популяционная экология животных: Мат. Межд. конф. - Томск, 2006. - С. 505-507.
- 41 Tatár S, Bajomi B, Specziár A, Tóth B and others (2017) Habitat establishment, captive breeding and conservation translocation to save threatened populations of the Vulnerable European mudminnow *Umbra krameri*. *Oryx*. 51: 718–729.
- 42 Leng X., Du H., Xiong W., Cheng P., Luo J., Wu J. Successful Ultrasonography-Assisted Artificial Reproduction of Critically Endangered Sichuan taimen (*Hucho bleekeri*). *Fishes* 2023, 8, 152. <https://doi.org/10.3390/fishes8030152>
- 43 Amirbekova F., Isbekov K.B., Assylbekova S.Z., Sharipova O.A., Adyrbekova K., Bulavina N. Biological Characteristics of a Rare and Vulnerable Species (*Schizothorax argentatus* (Kessler, 1874)) of Tokyraun River and Approbation of Its Artificial Reproduction. *Agriculture* 2022, 12, 1121. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081121>.
- 44 Mercy, T.V.A., Malika, V. and Sajan, S. (2013). Reproductive biology of *Puntius denisonii* (day 1865) an endemic ornamental cyprinids of the Western Ghats of India. *Indian J. Fish.* 60, 73-78.
- 45 Sundarabharathy, T.V., Edirisinghe, U. and Dematawewa, M.B. (2004). Captive breeding and rearing of fry and Juveniles of Cherry Barb (*Puntius titteya* Deraniyagala), a highly threatened endemic fish species in Sri Lanka. *Trop. Agric. Res.* 16, 137-149.
- 46 Sarkar, U.K., Deepak, P.K., Negi, R.S. et al. Captive breeding of endangered fish *Chitala chitala* (Hamilton-Buchanan) for species conservation and sustainable

utilization. *Biodivers Conserv* 15, 3579–3589 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10531-004-2935-6>.

47 Chaturvedi C. S., Yasmeen B., Pandey A. K. Artificial breeding of endangered golden mahseer, *Tor putitora* (hamilton-buchanan). *Biochem. Cell. Arch.* Vol. 13, No. 1, pp. 151-153, 2013 ISSN 0972-5075.

48 Nicola Rivers A.D., Jonathan Daly B.C., Peter T.S. New directions in assisted breeding techniques for fish conservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 2020, 32, 807–821. <https://doi.org/10.1071/RD19457>.

49 Павлов Д.С., Решетников Ю.С., Шатуновский М.И., Шилин Н.И. Редкие и исчезающие виды рыб СССР и принципы их включения в “Красную книгу” // *Вопр. ихтиологии*. 1985. Т. 25, вып. 1. С. 16–25.

50 Павлов Д.С., Савваитова К.А., Соколов Л.И., Алексеев С.С. Редкие и исчезающие животные. Рыбы. М.: Высш. шк., 1994. 334 с.

51 Frissell C.A., Liss W.J., Gresswell R.E., Nawa R.K., Ebersole L. A resource in crisis: changing the measure of salmon management// *Pacific salmon and their ecosystems: status and future options* (Stouder D.J., Bisson P.A., Naimann R.J., eds.) - New York: Chapman and Hall, 1997. - P. 411-446.

52 Reeves G.H., Hall J.D., Roelofs T.D., Hickman T.L., Baker C.O. Rehabilitating and modifying stream habitats // *Amer. Fisheries Society Spec. Pub.* - 1991.- Vol.19.- P. 519-558.

53 Матковский, А.К. Основные закономерности динамики численности муксуна *Coregonus muksun* реки Обь // *Вопр. рыбол.*, 2006а. - Т. 7. - №3. - С. 505-521.

54 Мамилов Н.Ш., Балабиева Г.К., Митрофанов И.В. Проблемы сохранения аборигенной ихтиофауны Иле-Балкашского бассейна // *Казахстанский зоологический ежегодник Selevinia*, 2011. – С. 66-71.

55 Хасенгазиева Г.К., Мамилов Н.Ш. Разнообразие гидробионтов дельты р. Иле в условиях меняющейся антропогенной нагрузки // *КазНУ им. аль-Фараби, Вестник - Серия экологическая*, 2020.- С. 79-86.

56 Махмудов А.Х. Дельта р. Или и проблема ее сохранения. 10 объединенный пленум Советского и республиканского комитетов по программе ЮНЕСКО «Человек и биосфера». – Алма-Ата: Наука, 1988. – С 48.

57 Русяева Г.К., Романова С.М. Антропогенное воздействие на некоторые экосистемы оз. Балхаш // 10 объединенный пленум Советского и республиканского комитетов по программе ЮНЕСКО «Человек и биосфера». – Алма-Ата: Наука, 1988. – С. 61.

58 Eschmeyer, W. N., Fricke, R., van der Laan, R. (Eds.), (2017). *Catalog of Fishes*. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> Electronic version (accessed 19 May 2023).

59 Bănărescu, P., & Coad, B. W. (1991). Cyprinids of Eurasia. In *Cyprinid Fishes* (pp. 127-155). Springer, Dordrecht.

60 Chen, X. L., Yue, P. Q., & Lin, R. D. (1984). Major groups within the family Cyprinidae and their phylogenetic relationships. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 9(4), 424-440.

- 61 Howes, G. J. (1991). Systematics and biogeography: an overview. In *Cyprinid fishes* (pp. 1-33). Springer Netherlands.
- 62 Cavender, T. M., & Coburn, M. M. (1992). Phylogenetic relationships of North American cyprinidae. *Systematics, historical ecology, and North American freshwater fishes*, 293-327.
- 63 Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- 64 Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., & He, X., (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 87, 46-49.
- 65 Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the World*, fourth ed. Wiley, New York.
- 66 Wang, X.Z., Li, J.B., He, S.P., 2007. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 157–170.
- 67 Saitoh, K., Chen, W.-J., Mayden, R.L., 2010. Extensive hybridization and tetraploidy in spined loach fish. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 1001–1010.
- 68 Yang, L., Mayden, R. L., Sado, T., He, S., Saitoh, K., & Miya, M., 2010. Molecular phylogeny of the fishes traditionally referred to Cyprinini sensu stricto (Teleostei: Cypriniformes). *Zool Scripta*, 39(6), 527-550.
- 69 Yang, J., Yang, J.X., Chen, X.Y., 2012a. A re-examination of the molecular phylogeny and biogeography of the genus *Schizothorax* (Teleostei: Cyprinidae) through enhanced sampling, with emphasis on the species in the Yunnan-Guizhou Plateau, China. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 50, 184–191.
- 70 Chen, W. J., Lavoué, S., & Mayden, R. L., 2013. Evolutionary origin and early biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Teleostei). *Evolution*, 67(8), 2218-2239.
- 71 Yang, L., Sado, T., Hirt, M. V., Pasco-Viel, E., Arunachalam, M., Li, J., & Miya, M., 2015. Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 85, 97-116.
- 72 Doadrio, I., 1994. Freshwater fish fauna of North Africa and its biogeography. *Annals of the Royal Central African Museum (Zoology)*, 275: 21-34.
- 73 Kottelat, M. & Freyhof, J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol. Berlin. 646 pp.
- 74 Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Изд.3-е. Л., 1932. Ч. 1. 543 с. Изд. 4-е. М.; Л.: АН СССР, 1949. Ч.2. 458 с.
- 75 Doadrio, I.,(1990). "Phylogenetic relationships and classification of western palaeartic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Aquat. Living Resour* 3, 265-282.
- 76 Tsigenopoulos, C.S., Durand, J.D., Unlu, E. & Berrebi, P. (2003) Rapid radiation of the Mediterranean *Luciobarbus* species (Cyprinidae) after the Messinian salinity crisis of the Mediterranean Sea, inferred from mitochondrial phylogenetic analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80, 207–222.
- 77 Bănărescu P. Vicariant patterns and dispersal in European freshwater fishes / P. Bănărescu // *Spixiana*. – 1989. – Vol. 12, No. 1. – P. 91-103.

78 Bănărescu P. Barbus / P. Bănărescu, N. G. Bogutskaya. – In: Bănărescu P. M., Bogutskaya N. G. (eds.). The Freshwater Fishes of Europe. –Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2003. – Vol. 5/II. – P. 1-10.

79 Machordom A., Doadrio I. Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (Luciobarbus, Cyprinidae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2001b. – Vol. 18, No. 2. – P. 252-263.

80 Machordom A., Doadrio I. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus Barbus // Proceedings of the Royal Society of London. – 2001a. – Vol. 268. – P. 1297-1306.

81 Левин Б. А. Морфоэкологическая диверсификация усачей рода *Barbus sensu stricto* и храмуль рода *Carpoia*: Автореф. дисс... канд. биол. наук / Б. А. Левин. – М., 2005. – 24 с.

82 Machordom, A., Doadrio, I., & Berrebi, P. (1995). Phylogeny and evolution of the genus *Barbus* in the Iberian Peninsula as revealed by allozyme electrophoresis. *Journal of Fish Biology*, 47(2), 211-236.

83 Böhme M. Freshwater fishes from the Pannonian of the Vienna Basin with special reference to the locality Sandberg near Götzendorf, Lower Austria / M. Böhme // Courier Forschungsinstitut Senckenberg. – 2002. – Vol. 237. –P. 151-173.

84 Zardoya R., Doadrio I. Molecular Evidence on the Evolutionary and Biogeographical Patterns of European Cyprinids // *Journal of Molecular Evolution*. – 1999. – Vol. 49. – P. 227-237.

85 Becker-Platen J.D. Litho- and biostratigraphic interpretation of radiometric Age determinations from the Upper Tertiary of Türkiye / J. D. Becker-Platen, L. Benda, P. Steffens // *Geological yearbook Reiche B.* - 1977. - Issue 25. - pp. 139-167.

86 Rutte E. Cyprinid pharyngeal teeth (pisces) from the Cenozoic of Turkey / E. Rutte, D. Becker-Platen // *Newsletters on Stratigraphy*. - 1980. - Vol. 8, No. 3. – P. 191-222.

87 Database of Vertebrates: fossil Fishes, Amphibians, Reptiles and Birds (fosFARbase) localities and taxa from the Triassic to the Neogene [интернет-ресурс]. – Режим доступа: www.wahre-staerke.com. (Дата обращения: 27.06.2023 г).

88 Пресноводная палеогеновая ихтиофауна СССР и Монголии / Е. К. Сычевская. – М.: Наука, 1986. – 158 с. (Тр. Совм. советско- монгольск. экспед., палеонтол., вып. 29).

89 Patterson C: *Osteichthyes: Teleostei. The Fossil Record 2*. Edited by: Benton MJ. 1993, London: Chapman & Hall, 621-656.

90 Obrhelová, N. (1969). The carp fish in Czechoslovak freshwater tertiary. *Casopis pro mineralogii a geologii*, 14(1), 39-52.

91 Cavender T. M. The fossil record of the Cyprinidae / T. M. Cavender. – In: J. Winfield and J. S. Nelson (eds.). *Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation*. – London: Chapman and Hill, 1991. – P. 34-54.

92 Bănărescu, P. (1973). Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia*, 5(1), 8.

93 Doadrio, I., & Carmona, J. A. (2003). Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia*, 59(2-3), 457-473. <http://dx.doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.260>.

94 Bănărescu, P. (1992). Zoogeography of fresh waters. Vol. 2, Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia. AULA-Vlg.

95 Rögl, F. (1997). Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie A für Mineralogie und Petrographie, Geologie und Paläontologie, Anthropologie und Prähistorie*, 279-310.

96 Rögl, F. (1999). Mediterranean and Paratethys. Facts and hypotheses of an Oligocene to Miocene paleogeography (short overview). *Geologica carpathica*, 50(4), 339-349.

97 Lundberg, J. G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. The biotic relationships between Africa and South America.

98 Myers, G. S. (1938). Fresh water fishes and West Indian zoogeography. US Government Printing Office.

99 Geiger, M. F., Herder, F., Monaghan, M. T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., & Denys, G. P., (2014). Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Mol Ecol Resour*, 14(6), 1210-122.

100 Casal-López, Perea, S., Yahyaoui, A. & Doadrio, I., (2015). Taxonomic review of the genus *Luciobarbus* Heckel, 1843 (Actinopterygii, Cyprinidae) from northwestern Morocco with the description of three new species. *Graellsia* 71(2):27.

101 Doadrio, I., Casal-López, M., Perea, S., & Yahyaoui, A. (2016). Taxonomy of rheophilic *Luciobarbus* Heckel, 1842 (Actinopterygii, Cyprinidae) from Morocco with the description of two new species. *Graellsia*, 72(1), e039.

102 Doadrio, I., Casal-López, M., & Perea, S. (2016). Taxonomic remarks on *Barbus moulouyensis* Pellegrin, 1924 (Actinopterygii, Cyprinidae) with the description of a new species of *Luciobarbus* Heckel, 1843 from Morocco. *Graellsia*, 72(2), 10-3989.

103 Митрофанов В.П., Дукравец Г.М., Мельников В.А., Баимбетов А.А. и др. Рыбы Казахстана: Т.3: Карповые (продолжение); Алма-Ата: Наука, 1988.- 304 С.

104 <https://www.marinespecies.org> (Дата обращения: 30.06.2023 г.)

105 <https://www.fishbase.se> (Дата обращения: 30.06.2023 г.)

106 Esmaeili, H.R.; Mehraban, H.; Abbasi, K.; Keivany, Y.; Coad, B.W. Review and updated checklist of freshwater fishes of Iran: Taxonomy, distribution and conservation status. *Iran J. Ichthyol.* 2017, 4, 1–114

107 Орлова И.В., Терещенко А.М., Мурова Е.В., Климов Ф.В. Особенности биологии и морфологии аральского и туркестанского усачей в бассейне р. Сырдарья // *Tethys Aqua Zoological Research* III.2007. 93-102 с.

108 Галактионова, Е.Л. Состояние, воспроизводство и сохранение сырдарьинской популяции аральского усача *Barbus brachycephalus* Kessler в условиях зарегулированного стока // Охрана и рациональное использование живой природы водоемов Казахстана: материалы Междунар. конф. - Алма-Ата, 1969. — С. 86–89.

109 Маркун М.И. 1933. Аральский усач, его систематика и биология. Труды Аральского отд. ВНИМОПХ, Аральск, 2: 5–47 с.

110 Павловская Л.П. 1966. Морфологическая характеристика и некоторые вопросы биологии Аральского усача в речной период жизни. Рыбы и гидробиологический режим Южноаральского бассейна, Ташкент: 51–120 с.

111 Усманова Р.Г. 1971. Половой диморфизм, возрастная и локальная изменчивость туркестанского усача *Barbus capito conocephalus* Kessler бассейна р. Кашкадарья. Вопр. ихтиол., 11(67): 203–216 с.

112 Ermakhanov, Z.K.; Zhubanov, K.U. The Status of Rare and Threatened Species of Fishes of the Small Aral Sea. Portal of Knowledge about Water Resources and Ecology of Central Asia. 2011. Available online: <http://www.cawater-info.net> (accessed on 9 March 2023).

113 Маркун М.И. Аральский усач, его систематика и биология //Труды Аральского отдела ВНИМОПХ. Аральск, 1933. Т.2. С 3-45.

114 Максун В.А. Аральский усач в Балхаше// Рыбное хозяйство, 1951. № 6. С.40.

115 Нездолий В.К. Скот икры аральского усача в р.Или // Биологические основы рыбного хозяйства Средней Азии и Казахстана, Ашхабад: Ылым, 1974. №2. С. 63-63.

116 Башунов В.С., Цой В.Н. Условия воспроизводства и численность нерестового стада аральского усача в низовьях р.Или // Редкие животные Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1986. С. 196-198.

117 Дукравец Г.М. Мамилов Н.Ш. Состояние популяций редких и исчезающих видов рыб в бассейнах рек Или и Чу // КазГУ - Алматы, 1994 - 25 с.

118 Турдаков Ф.А. Рыбы Киргизии. Фрунзе, 1952. 72 с.2 издание. Фрунзе; Академия наук КиргССР, 1963. 284 с.

119 Пивнев И.А. Рыбы бассейнов рек Чу и Талас. Фрунзе: Илим, 1985. 190 с.

120 Фортунатова М.А., Курбатова Е.С., Рйская А.А. К вопросу о динамике стад промысловых рыб Аральского моря // Материалы по ихтиофауне и режиму вод бассейна Аральского моря. Москва: МОИП. 1950. С.112-170.

121 Романычева О.Д. Скот и питание молоди аральского усача в реке Сырдарье // Рыбное хозяйство, 1948, № 9. С. 37-40.

122 Никольский Г.В., Фортунатова М.А. Ирригационное строительство и рыбное хозяйство Аральского моря // Материалы по ихтиофауне и режиму бассейна Аральского моря. Москва: МОИП, 1950. С. 6-20.

123 Макеева А.П. Развитие аральского усача *Barbus brachycephalus* Kessler // Вопросы ихтиологии, 1958. Выпуск 11, С. 86-101.

124 Потехина Е.В. Влияние ирригационных систем на скат молоди усача в р.Сырдарье // Материалы второй научной конференции аспирантов. Ростов-на-Дону: РГУ, 1960. С. 163- 167.

125 Даирбаев М. Развитие ирригации и некоторые вопросы воспроизводства промысловых рыб бассейна р. Сырдарьи // Рыбные запасы Аральского моря. Ташкент: Наука, 1964. С. 148-150.

126 Коновалов П.М. О скате молоди усача и некоторых других видов рыб в Сырдарье на второй год после ее зарегулирования в нижнем течении // Рыбные ресурсы водоемов Казахстана и их использование. Алма-ата: Наука, 1966. Выпуск 5. С. 172-182.

127 Галактионова Е.Л. Воспроизводство и эксплуатация запасов аральского усача в условиях зарегулированного стока реки // Биологические основы рыбного хозяйства на водоемах Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1966. С. 73-76.

128 Галактионова Е.Л. Овогенез у аральского усача // Биологические основы рыбного хозяйства республик Средней Азии и Казахстана. Душанбе: Дониш, 1976. С. 259-261.

129 Павловская Л.П. Жолдасова И.М. О нарушении гаметогенеза у аральского усача на Амударье в условиях гидростроительства // Биологические основы рыбного хозяйства республик Средней Азии и Казахстана. Душанбе: Дониш, 1976. С. 334-335.

130 Мамиллов Н.Ш., Галушак С.С., Кожобаева Э.Б. Усачи ирригационных систем нижнего течения р. Сырдарьи и перспективы их сохранения в бассейне Аральского моря // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская № 2 (260), 2007. С. 29-33.

131 Балымбетов К.С., Жубанов К.У., Галушак С.С. Встречаемость Аральского (*B.brachycephalus* Kessler) и туркестанского (*B. capito* Guldenstadt) усачей в ирригационных системах нижнего течения реки Сырдарьи // Selevinia, 2003. С. 215-216.

132 Маркова Е.Л. Материалы к биологии аральского ходового усача *Barbus brachycephalus* K.// Сборник работ по ихтиологии и гидробиологии. Алма-Ата: Академия наук КазССР, 1961. Выпуск 3. С. 154-170.

133 Галактионова Е.Л. Материалы по биологии аральского усача // Сборник работ по ихтиологии и гидробиологии. Алма-Ата: Академия наук КазССР, 1961. Выпуск 3. С. 202-213.

134 Сергеева Н.Г. Питание туркестанского усача в Шардаринском водохранилище// Тезисы докл.конференции по вопросам рыбного хозяйства республик Средней Азии и Казахстана. Фрунзе: Илим, 1968. С.127-128.

135 Ерещенко В.И.Разработка биологических основ рыбохозяйственного освоения Шардаринского, Каратомарского, Сергеевского, Вячаславского водохранилищ // Отчет о научно-исследовательской работе № ГР70055685. КазНИИРХ. Балхаш: Усть-Каменогорск, 1970. 292 с.

136 Кузнецова В.М. разработка биологических основ рыбохозяйственного освоения Бугуньского и др. водохранилищ // Отчет о научно-исследовательской работе № ГР70055685. -Усть-Каменогорск, 1972. 176 с.

137 Митрофанов В.Л. Карповые рыбы Казахстана: Диссертация доктора биологических наук. Алма-ата, 197. 404 с.

138 Максунув В.А. О сроках нереста туркестанского усача *Barbus capito conocephalus* Kessler (Cyprinidae) // Вопросы ихтиологии. 1982. Том 22. Выпуск 5. С. 888-889.

139 Расулов А.Х. Гаметогенез и половые циклы туркестанского усача (*Barbus capito conocephalus* Kessler) Кайракумского водохранилища: Автореферат. Кандидата биологических наук. М.: АН СССР. 1974. 26 с.

140 Ахмедбаева Ф. Некоторые морфобиологические особенности туркестанского усача (*Barbus capito conocephalus* Kessler) в низовьях реки Нарын // Узбекский биологический журнал, 1981. № 4. С.54-57.

141 Максунув В.А. Материалы к морфометрической и биологической характеристике туркестанского усача *Barbus capito conocephalus* Kessler верховьев реки Сырдарьи // Вопросы ихтиологии, 1962. Том 2. Выпуск 4 (25). С. 592-596.

142 Миськова А.А. Экология молоди сазана и туркестанского усача Южносурханского водохранилища: Автореферат. Диссертация кандидата биологических наук, Ташкент: ТашГУ, 1968. 26 с.

143 Аманов А.А. Туркестанский усач (*Barbus capito conocephalus* Kessler) Учкизилского водохранилища // Доклад Академии наук УзССР, 1964. № 55 С. 53-55.

144 Мухамедиев М.А. К биологии туркестанского усача Керкидонского водохранилища // Биологические основы рыбного хозяйства республик Средней Азии и Казахстана. Ташкент; Фергана: Академия наук УзССР, 1972. С.226-228.

145 Максунув В.А. Промысловые рыбы Таджикистана. Душанбе. 1968, 100 с.

146 Кузнецова В.М. Разработка биологических основ рыбохозяйственного освоения Богеньского и др. водохранилищ // Отчет о научно-исследовательской работе. КазНИИРХ.- Усть-Каменогорск, 1972. 176 с.

147 Биологическое обоснование на изъятие аральского усача из Арало-Сырдарьинского бассейна, из Или-Балхашского водного бассейна с целью сохранения биоразнообразия и восстановления запасов редких и исчезающих видов рыб, путем организаций искусственного воспроизводства, с последующей реинтродукцией в Арало - Сырдарьинский и Балхаш-Илийский бассейны. ТОО «КазНИИРХ» – Алматы, 2011. – 62 с.

148 Мюнтцинг А. Генетика. Общая и прикладная. / Пер. со 2-ого английского издания под ред. В.Н. Столетова Изд: М. Мир 1967г.-612 с.

149 Токтосунов А.Т., Мазик Е.Ю., Экологическая цитогенетика рыб Тянь-Шаня, АН КирССР, ин-т биологии.-Ф.:Илим, 1991.-188с.

150 Катасонов В.Я., Гомельский Б.И. Селекция с основами генетики.- Изд.М.: Агропромиздат, 1991.- 208с.

- 151 Yang, L., Sado, T., Hirt, M. V., Pasco-Viel, E., Arunachalam, M., Li, J., Wang, X., Freyhof, J., Saitoh, K., Simons, A. M., Miya, M., He, S. and Mayden, R. L. 2015. Phylogeny and polyploidy: Resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 85: 97–116.
- 152 Gaffaroğlu, M., Karasu-Ayata, M. & Unal-Karakus, S. Karyomorphology of Two Cyprinid Barbels (Teleostei: Cyprinidae) from Gediz River, Turkey. *Cytol. Genet.* 56, 541–547 (2022).
- 153 Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. - М.: Наука, 1985.-299 с.
- 154 Uyeno, T., & Smith, G. R. (1972). Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes.
- 155 Schultz, R. J. (1980). Role of polyploidy in the evolution of fishes. In *Polyploidy* (pp. 313-340). Springer US.
- 156 Comber, S. C., & Smith, C. (2004). Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), P. 431-442.
- 157 Lagier KF, Bardach JE, Miller RR, Passino DRM. (1977). *Ichthyology*, 2nd edn. New York: John Wiley and Sons.
- 158 Alves, M. J., Coelho, M. M., & Collares-Pereira, M. J. (2001). Evolution in action through hybridization and polyploidy in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica*, 111(1-3), P. 375-385.
- 159 Tsigenopoulos, C. S., Kotlik, P., & Berrebi, P. (2002). Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biol. Journal of the Linnean Society*, 75(1), P. 83-99.
- 160 Guégan, J. F., Rab, P., Machordom, A., & Doadrio, I. (1995). New evidence of hexaploidy in 'large' African *Barbus* with some considerations on the origin of hexaploidy. *Journal of Fish Biology*, 47(2), P. 192-198.
- 161 Levin B. A., Freyhof, J., Lajbner Z., Perea S., Abdoli A., Gaffaroğlu M., Doadrio, I. (2012). Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), P. 542-549.
- 162 Chenuil, A., Galtier, N., & Berrebi, P. (1999). A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity*, 82(4), P.373-380.
- 163 Darwall, W. R. T. and Freyhof, J. (2016) Lost fishes, who is counting? The extent of the threat to freshwater fish biodiversity. In: *Conservation of Freshwater Fishes*. Closs, G. P., Krkosek, M., and Olden, J. D. (eds). Cambridge University Press: Cambridge.
- 164 O'Connell D.P., Kelly D.J., Analuddin K., Karya A., Marples N.M., Martin T.E. Adapt taxonomy to conservation goals// *Science*, 2020: 369 (6508), 1172. DOI: 10.1126/science.abd7717.
- 165 Arif I.A., Khan H.A. (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiver Conserv* 32(1):9–17.

- 166 Theissinger K., Fernandes C., Formenti G. et al. Review: How genomics can help biodiversity conservation // Trends in Genetics, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.01.005>.
- 167 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Biol Sci* 270(1512):313–21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- 168 Liu L, Panhwar SK, Gao T, Han Z, Li C, Sun D, Song N (2017) New genetic evidence from three keel-backed Liza species based on DNA barcoding confirms morphology-based identification. *Pak J Zool* 49(5):1901–1907. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.5>. 1901.1907.
- 169 Lavoué S, Bertrand JAM, Shen K, Ratmuangkhwang S, Sado T, Miya M, Azizah MNS (2019) Deep genetic differentiation between two morphologically similar species of wolf herrings (Teleostei, Clupeoidei, Chirocentridae). *J Appl Ichthyol* 36(3): 693–700. <https://doi.org/10.1111/jai.13886>.
- 170 Hayden B, Pulcini D, Kelly-Quinn M, O’Grady M, Caffrey J, McGrath A, Mariani S (2010) Hybridization between two cyprinid fishes in a novel habitat: genetics, morphology and life-history traits. *BMC Evol Biol* 10:169. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-169>.
- 171 Ibrahim O., Yılmaz C. (2003). Fish Population Genetics and Molecular Markers: II- Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture (Review): *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3: P. 51-79.
- 172 Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- 173 O’Connell, M. and Wright, J.M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 331-363.
- 174 Parker, P.G., Allison, A., Snow, A.A., Schug, M.D., Gregory, C., Booton, G.C. and Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361–382.
- 175 Hallerman, E.M. 2003. *Population genetics: principles and applications for fisheries scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 458 pp.
- 176 Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers of population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199- 203.
- 177 Abdul-Muneer P. M. *Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management*. Hindawi Publishing Corporation. *Genetics Research International*. Volume 2014, Article ID 691759, 11 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/691759>.
- 178 M.M. Ferguson and R. G. Danzmann, “Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?” *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 55, no. 7, pp. 1553–1563, 1998.
- 179 Chenuil, A., Desmarais, E., Pouyaud, L., & Berrebi, P. (1997). Does polyploidy lead to fewer and shorter microsatellites in *Barbus* (Teleostei: Cyprinidae)? *Molecular Ecology*, 6(2), P. 169-178.

- 180 Callejas, C., & Ochando, M. D. (2000). Recent radiation of Iberian barbel fish (Teleostei, Cyprinidae) inferred from cytochrome b genes. *Journal of Heredity*, 91(4), P. 283-288.
- 181 Callejas, C., & Ochando, M. D. (2002). Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity*, 89(1), P. 36-43.
- 182 Lajbner, Z., Šlechtová, V., Šlechta, V., Švátora, M., Berrebi, P., & Kotlik, P. (2009). Rare and asymmetrical hybridization of the endemic *Barbus carpathicus* with its widespread congener *Barbus barbus*. *Journal of Fish Biology*, 74(2), P. 418-436.
- 183 Schreiber, A. (2009). Comparative allozyme genetics and range history of the European river barbel (Teleostei, Cyprinidae: *Barbus barbus*) in the Rhine/upper Danube contact area. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47(2), P. 149-159.
- 184 Waldbieser, G.C. and Wolters, W.R. (1999) Application of polymorphic microsatellite loci in a channel catfish *Ictalurus punctatus* breeding program. *Journal of the World Aquaculture Society* 30, 256–262.
- 185 Hughes, C.R. and Queller, D.C. (1993) Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* 2, 131–137.
- 186 Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 285–288.
- 187 Liu, Z.J., Tan, G., Kucuktas, H., Li, P., Karsi, A., Yant, D.R. and Dunham, R.A. (1999e) High levels of conservation at microsatellite loci among ictalurid catfishes. *Journal of Heredity* 90, 307–312.
- 188 Liu, Z.J., Tan, G., Li, P. and Dunham, R.A. (1999f) Transcribed dinucleotide microsatellites and their associated genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 190–194.
- 189 Tan, G., Karsi, A., Li, P., Kim, S., Zheng, X., Kucuktas, H., Argue, B.J., Dunham, R.A. and Liu, Z.J. (1999) Polymorphic microsatellite markers in *Ictalurus punctatus* and related catfish species. *Molecular Ecology* 9, 190–194.
- 190 O’Connell M., Danzmann R.G., Cornuet J-M., Wright J.M., Ferguson M.M. Differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1997; 54(6):1391–1399.
- 191 Estoup A, Presa P, Krieg F, Vaiman D, Guyomard R. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout) *Heredity*. 1993; 71(5):488–496.
- 192 Gante, H. F., Alves, M. J., & Dowling, T. E. (2011). Paralog-specific primers for the amplification of nuclear loci in tetraploid barbels (*Barbus*: Cypriniformes). *Journal of Heredity* 2011:102(5):617–621 doi:10.1093/jhered/esr059.
- 193 Liu, Z.J. and Dunham, R. (1998a) Genetic Linkage and QTL Mapping of Ictalurid Catfish. Circular Bulletin 321, Alabama Agricultural Experiment Station, 19 pp. Available at: www.intl-pag.org.

- 194 Capili, J.C. and Skibinski, D.O.F. (1996) Mitochondrial DNA restriction endonuclease and isozyme analyses of three strains of *Oreochromis niloticus*. In: Pullin, R.S.V., Lazard, J., Legendre, M., Amon-Kottias, J.B. and Pauly, D. (eds) Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. No. 41, ICLARM, pp. 266–272.
- 195 Agnese, J.F., Adepo-Gourne, B., Abban, E.K. and Fermon, Y. (1997) Genetic differentiation among natural populations of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity* 79, 88–96.
- 196 Wirgin, I.I., Proenca, R. and Grossfield, J. (1989) Mitochondrial DNA diversity among populations of striped bass in the southeastern United States. *Canadian Journal of Zoology* 67, 891–907.
- 197 Bermingham, E., Lamb, T. and Avise, J.C. (1986) Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *Journal of Heredity* 77, 249–252.
- 198 Bentzen, P., Leggett, W.C. and Brown, G.C. (1988) Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics* 118, 509–518.
- 199 Rex A. Dunham. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. Auburn University, Alabama, USA. CABI Publishing. 2004. 385 P.
- 200 Billington, N. 2003. Mitochondrial DNA. E. M. Hallerman (Ed.), *Population genetics: principles and applications for fisheries scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 59-100 P.
- 201 Farias I.P., Ortı G., Sampaio I., Schneider H., Meyer A. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes // *Journal of Molecular Evolution* 53 (2001), pp. 89-103.
- 202 Esposti DM, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A (1993) Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143:243–271.
- 203 Meyer A, Wilson C (1990) Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J Mol Evol* 31:359–364.
- 204 Kumazawa Y, Nishida M (2000) Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Mol Biol Evol* 17(2):1869–1878.
- 205 Lydeard C, Roe KJ (1997) The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In: Kocher TD, Stepien CA (eds) *Molecular systematics of fish*. Academic Press, New York, pp. 285–303.
- 206 Rocha-Olivares A, Rosenblatt RH, Vetter RD (1999) Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastes* (*Sebastes*, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences. *Mol Phy Evol* 11(3):441– 458.

- 207 Lovejoy NR, de Araujo MLG (2000) Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Mol Ecol* 9(3):259–268.
- 208 Kirchman JJ, Whittingham LA, Sheldon FH (2000) Relationships among cave swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome b data. *Mol Phy Evol* 14(1):107–121.
- 209 Martin AP, Bermingham E (1998) Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequence. *Mol Phyl Evol* 9:192–203.
- 210 Sturmbauer C, Verheyen E, Meyer A (1994) Mitochondrial phylogeny of the Lamprologini, the major substrate spawning lineage of cichlid fishes from Lake Tanganyika in Eastern Africa. *Mol Biol Evol* 11:691–703.
- 211 Roe KL, Conkel D, Lydeard C (1997) Molecular systematic of Middle American cichlid fishes and evolution of trophic-types in ‘*Cichlasoma (Amphilophus)*’ and *C. (Thorichthys)*. *Mol Phyl Evol* 7:366–376.
- 212 Carr, S.M. and Marshall, H.D. 1991. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 48-52.
- 213 Ciftci Y., Eroglu O., Firidin S. Mitochondrial Cytochrome b Sequence Variation in Three Sturgeon Species (*A. stellatus* Pallas, 1771, *A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833, *H. huso* Linnaeus, 1758) from the Black Sea Coasts of Turkey // *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 13: 291-303 (2013). ISSN 1303-2712. DOI: 10.4194/1303-2712-v13_2_11.
- 214 Тимошкина Н. Н., Водолажский Д. И., Усатов А. В. Молекулярно - генетические маркеры в исследовании внутри и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // *Генетика популяций и эволюция. экологическая генетика*, том VIII, № 1, 2010. 12-24 с. ISSN 1811–0932
- 215 Skibinski, D.O.F. 1994. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: *Proceedings of the Conference on Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, 10–16 Sept 1992, Bangor, UK. (Beaumont, A., ed.). Chapman and Hall, London: 177-199.
- 216 Magoulas, A. 1998. Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. *Cahiers Options Mediterrannes*, 34: 153- 168.
- 217 Zhang, D.X. and Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584.
- 218 Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 397–423.
- 219 Chan, K. M. A., & Levin, S. A. (2005). Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution*, 59, 720–729.
- 220 Funk, D. J., Nosil, P., & Etges, W. J. (2006). Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa.

Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, 103(9), 3209-3213.

221 Zink, RM., & Barrowclough, G. (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17, 2107–2121.

222 Toews, D. P., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21(16), 3907-3930.

223 Hebert, P. D. N., Ratnasingham S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 270, S96-S99.

224 Рябова Г. Д. Генетическая изменчивость природных популяций и domestцированных стад осетровых России (атлас аллозимов) / Г. Д. Рябова, В. О. Климонов, Е. И. Шишанова. М.: Россельхозакадемия, 2008. 94 с.

225 Козлова Н., Базелюк Н., Файзулина Д., Стоногина Е. "Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб". Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство, 2013 (3): 113-117.

226 Nedoluzhko AV, Sharko FS, Tsygankova SV, et al. Molecular phylogeny of one extinct and two critically endangered Central Asian sturgeon species (genus *Pseudoscaphirhynchus*) based on their mitochondrial genomes. *Sci Rep*. 2020; 10(1):722. Published 2020. doi:10.1038/s41598-020-57581-y.

227 QGIS Development Team, 2021. QGIS 3.22.1. Geographic InformationSystem. Open-Source Geospatial Foundation Project:<http://qgis.osgeo.org>. (Дата обращения: 11.01.2023 г.).

228 Hijmans, Robert J., Mariana Cruz, Edwin Rojas and Luigi Guarino, 2001. DIVAGIS, version 1.4. A geographic information system for the management and analysis of genetic resources data. Manual. International Potato Center, Lima, Peru.

229 Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. - М.: Пищевая промышленность, 1966. - 376 с.

230 Eschmeyer's Catalog of Fishes: (Дата обращения: 19.12.2022 г.) <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

231 Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с таксономическими комментариями. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 389 с.

232 Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (accessed 19 May 2023).

233 Rohlf, F. J., 2003. TpsDig, Digitize Landmarks and Outlines. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook.

234 <https://www.qiagen.com> (Дата обращения: 20.06.2023 г.)

235 Longwu, G., Cuiyun, L., Guangxiang, T. et al. Development and characterization of twenty microsatellite markers for the endangered fish *Luciobarbus capito*. *Conservation Genet Resour* 4, 865–867 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9660-3>.

- 236 Chenuil, A., Crespin, L., Pouyaud, L. & Berrebi, P., 2000, Movements of adult fish in a hybrid zone revealed by microsatellite genetic analysis and capture-recapture data., *Freshwater Biology*, 43, 121-131.
- 237 Palumbi, S.R., 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics* Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- 238 Doadrio I, Perdices A. Phylogenetic relationships among the Ibero- African cobitids (*Cobitis*, cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005; 37, 484-493.
- 239 <http://www.macrogen.com> (Дата обращения: 22.06.2023 г.)
- 240 Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* 7, 544–548 (2007).
- 241 Лакин Г.Ф. Биометрия – Москва: Высшая школа, 1990. - 352 с.
- 242 Hammer Ø., Harper D. A., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – Т. 4. – №. 1. – С. 9.
- 243 Currie-Fraser E., Shah P. Data analysis using GeneMapper v4.1: Comparing the Newest Generation of GeneMapper Software to Legacy Genescan and Genotyper Software. *J Biomol Tech.* 2010 Sep; 21(3 Suppl): S31.
- 244 Meirmans, P. G. (2020). Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126-1131.
- 245 Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- 246 Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- 247 Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945- 959.
- 248 Bostein D, White R.L, Sckolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:317–331.
- 249 Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., et al. "CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K". *Molecular Ecology Resources* 15(5): 1179-1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387.
- 250 Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 2005, 14, 2611–2620.
- 251 Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992 Jun; 131(2):479-91. doi: 10.1093/genetics/131.2.479.
- 252 Buerkle, C. Alex. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Molecular Ecology Notes* 5: 684-687.

253 Meirmans, P. G. (2020). Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126-1131.

254 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.

255 National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Дата обращения: 14.01.2023).

256 Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P et al (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across large model space. *Syst Biol* 61(3):539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

257 Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M et al (2010) ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Res* 38(2):14–18.

258 Akaike, H., (1973). Information theory and an extension of the Maximum Likelihood principle. In: B. N. Petrov & F. Csaki (eds.). *Proceedings of the second International Symposium on Information Theory*. Akademi Kiado. Budapest: 267-281.

259 Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083>.

260 Rambaut A (2018) FigTree v1.4.4. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

261 Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

262 Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

263 Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(W1),W232-W235. DOI: 10.1093/nar/gkw256.

264 Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

265 Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

266 Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1188-1195. DOI: 10.1093/molbev/mst024/.

267 Bandelt, H. J. Forster, P., & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.

- 268 Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). Data from: PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecology Evolution* 6(9), 1110–1116. DOI: 10.1111/2041-210X.12410.
- 269 Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- 270 Maxim I. Pyatkov and Anton N. Pankratov. SBARS: fast creation of dotplots for DNA sequences on different scales using GA-,GC-content // *Bioinformatics* : 30. — 2014. — № 12. — С. 1765—1766. — doi:10.1093/bioinformatics/btu095.
- 271 Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989, 123, 585–955.
- 272 Fu, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1997, 147, 915–925.
- 273 Никольский Г.В. Рыбы среднего и нижнего течения р.Чу // Ежегодник зоол.музея АН СССР. 1931. Т.32. Вып.2. С. 227-268.
- 274 Адырбекова К.Б. Молекулярно-генетическое изучение некоторых редких и исчезающих видов рыб Казахстана // Международная научно-практическая конференция к 70-летию Алтайского филиала ТОО "Научно-производственный центр рыбного хозяйства" Развитие рыбной отрасли: Актуальные проблемы и пути их решений", уровень Международный, Казахстан, г. Усть-Каменогорск, С. 12-19. 2022.
- 275 Адырбекова К.Б., Исбеков К.Б. Методы выделения геномной ДНК некоторых редких видов рыб // Вестник науки КАТУ им.С.Сейфуллина. - 2022. - №3 (114). –Ч.1. - С. 63-71.
- 276 Schlottcr C. Microsatellites. *Molecular Genetic analysis of Populations*// Ed. Hoelzel a. R. Oxford Univ. Press., 1998. P. 237 260.
- 277 Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы её изучения // Информацион. Вести. ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 74-96.
- 278 Brown B., Epifanio J. Nuclear DNA. *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists* // Ed. E.M. Hallerman. amer. Fish. Society. Bethesda, Maryland, USA. 2003. P. 101-126.
- 279 Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шитова М.В. Межрегиональная дифференциация кеты Сахалина и Южных Курил по микросателлитным локусам // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 7. С. 956-963.
- 280 Wennevik, V., Skaala, O., Titov, S.F. et al. Microsatellite Variation in Populations of Atlantic Salmon from North Europe. *Environmental Biology of Fishes* 69, 143–152 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000022890.15512.29>.
- 281 Adyrbekova, K.; Perea, S.; Doadrio, I. Development and Characterization of Fifteen Polymorphic Microsatellite Loci for Rare and Endangered Species within *Luciobarbus Heckel, 1843 Genus in the Aral Basin and Their Conservation Application*. *Fishes* 2024, 9, 169. <https://doi.org/10.3390/fishes9050169>.
- 282 Картавцев Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика: Учебное пособие. – Владивосток: Издательство Дальневосточного государственного университета, 2-е изд. 2008. 25 п.л. ил. 182, библи. – 562.

- 283 Yang L., Sado T., Vincent H.M., Pasco-Viel E., Arunachalam M., Li J., Wang X., Freyhof J., Saitoh K., Simons A.M., Miya M., He S., Mayden R.L. Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol Phylogenet Evol.* 2015 Apr;85:97-116. doi: 10.1016/j.ympev.2015.01.014.
- 284 Eizaguirre C., Baltazar-Soares M. Evolutionary conservation—evaluating the adaptive potential of species. *Evolutionary Applications* published by John Wiley & Sons Ltd 7 (2014) 963–967. doi:10.1111/eva.12227.
- 285 Dumont H.J. Endemism in the Ponto-Caspian Fauna, with Special Emphasis on the Onychopoda (Crustacea). *Advances in Ecological Research*, vol. 31, pp.: 181-196, 2000.
- 286 Никольский, Г.В. Структура вида и закономерности изменчивости рыб / Послесл. Ю. Е. Лапина. - Москва: Пищ. пром-сть, 1980.
- 287 Rass, T.S. *Animal Life. T. Lancelets, Cyclostomes, Cartilaginous Fishes, Bony Fishes; Education: Moscow, Russia, 1983; 576 p.*
- 288 Линдберг Г.У., Герд А.С. Словарь названий пресноводных рыб СССР. Издательство «Наука», Ленинград. 1972 г.
- 289 Берг Л.С. Рыбы Туркестана. СПб.: Типография Исидора Гольдберга, 1905. — 264 с.
- 290 Берг Л.С. Фауна России, Рыбы, III, вып. 2, 1914. С-Пб.: Типография Императорской Академии наук, 1911. — 608 с.
- 291 Кесслер К.Ф. Изв. Общ. любит, ест., X, вып. 1, 1872, стр. 52.
- 292 Coad B.W. Fresh water fishes of Iran. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae* 29:1–64. 1995.
- 293 Banarescu, P. M.; Bogutskaya, N. G. (eds.). *The freshwater fishes of Europe. Cyprinidae 2. Part II: Barbus. AULA. v. 5/II.: I-x, P 454. 2003.*
- 294 Jouladeh-Roudbar, A., S. Eagderi S., Esmaeili H. R. First record of the striped bystranka, *Alburnoides taeniatus* (Kessler, 1874) from the Hari River basin, Iran (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* v. 4 (no. 5): 788-791. 2016. E-ISSN: 2320-7078.
- 295 Jouladeh-Roudbar, A., Ghanavi, H. R., & Doadrio, I. (2020). Ichthyofauna from Iranian freshwater: Annotated checklist, diagnosis, taxonomy, distribution and conservation assessment. *Zoological Studies* 59:21 (2020) doi:10.6620/ZS.2020.59-21.
- 296 Eagderi, S., Mouludi-Saleh A., Hosseini S. V., Mousavi-Sabet H. Documentation of the Turkestan barbel, *Luciobarbus conocephalus* (Kessler, 1872) in the Iranian part of Hari River basin (Teleostei: Cyprinidae: Barbinae). *Iranian Journal of Ichthyology* v. 8 (no. 1). P. 67-75. 2021.
- 297 Cicek E., Fricke R., Eagderi S., Sungur S., Coad B. W., Hamdard M. H. Fishes of Afghanistan; a revised and updated annotated checklist. *Zootaxa* 5305 (no. 1): 1-69. 2023.
- 298 Адырбекова К.Б., Шалгимбаева Г.М. Генетическая идентификация Аральского усача в бассейне реки Сырдарья // Актуальные проблемы биоразнообразия и биотехнологии: материалы Международной научно-

практической конференции", уровень Международный, Россия, Астраханский государственный университет. 2021. С. 104-107. DOI 10.21672/978-5-9926-1348-3-104-107.

299 Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Mol Ecol Notes. 2007;7(3):355-364. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

300 Адырбекова К.Б. Поиск полиморфных микросателлитных локусов для Аральского усача *Luciobarbus brachycephalus* Kessler //Материалы международной конференции молодых ученых Farabi alemi. 243 с. 2023.

301 Адырбекова К.Б. Тетраплоидность усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна при анализе ядерного генома // Сборник материалов Международной научно-практической конференции к 90 –летию Балхашского филиала «Рыбохозяйственные научные исследования: Опыт, проблемы и перспективы развития», г. Балхаш, С.33-36. 2023.

302 Adyrbekova K., Isbekov K.B., Barakbayev T.T., Iskhakhov G.Z. Current State of Rare and Endangered Barbels of the Genus *Luciobarbus* Heckel, 1843 in the Aral–Syrdarya Basin (Kazakhstan) and Prospects for Their Conservation (A Review). Biology 2023, 12, 489. <https://doi.org/10.3390/biology12040489>.

303 May, B. and Krueger, C.C. (1990) Use of allozyme data for population analysis. In: Whitmore, D.H. (ed.) Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 157–172.

304 Allendorf F. W. & Luikart G. (2009). Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.

305 Chapuis M.P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Mol Biol Evol 24(3): P. 621–631.

306 Reed, D.H. and Frankham, R. (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. Evolution 55, 1095–1103.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Фотографии исследованных точек сбора и изученных экземпляров усачей



Рисунок А.1 – Гидросооружение Басыкара, местообитание усачей



Рисунок А.2 – Экспедиционный выезд и место постановки сплавных сетей по р. Сырдарья перед гидросооружением Басыкара (Кызылординская область)



Рисунок А.3 – Местообитание усачей р. Сырдарья



Рисунок А.4 – Усачи в прибрежных садках вдоль р. Сырдарья для передержки при отборе генетического материала



Рисунок А.5 – Поимка крупновозрастных усачей вдоль р. Сырдарья



Рисунок А.6 – Усачи для морфо-биологического анализа из ирригационных каналов (рисовые чеки) Кармакшинского района Кызылординской области

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Синтезированные олигонуклеотиды и первичные данные ядерных маркеров



Applied Biosystems UK.
3 Fountain Drive
Inchinnan
Renfrewshire
PA4 9RF

Page : 1

Despatch Note

Despatch Note No. 302930

Oligos this shipment 14 of 14

Customer Lourdes Alcaraz Institute MUSEO NACIONAL CIENCIAS NATURA Customer No. 6601 Delivery Address 10256053 C/ JOSE GUTIERREZ ABASCAL 2 MADRID SPAIN 28006	Purchase Order No. 68468854 Despatch Date : 08/11/2022 Order Received: 00/00/00 Urgency 48H Delivery Method CUR AB Order No. 392754 0007968754
---	--

100nm.

100µl

Oligo Ref.	Item No	Part No.	Delivered End Product	Dye	MS QC Passed *	HPLC	Lyoph	Length	Mol Wt	Concn/Amount
237F	10 1.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	PET	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	7072	10 nmol
	2731143	Sequence	GAA GGT CAC GTG GTT GTC CA							
182	20 2.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	VIC	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6732	10 nmol
	2731144	Sequence	GCT CTC GTT CCA GTC CAG AC							
164	30 3.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	VIC	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6877	10 nmol
	2731145	Sequence	GGC GTT GTT GAG CCA ATC AG							
417	40 4.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	NED	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6740	10 nmol
	2731146	Sequence	CCA AGT CTC GCT ATC CTC GG							
287	50 5.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	PET	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6994	10 nmol
	2731147	Sequence	TAA TTA GCA ACA GGC CCG CA							
230	60 6.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	PET	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	7032	10 nmol
	2731148	Sequence	ATT GAG GAT CCC GAG GCT CT							
306	70 7.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	NED	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6709	10 nmol
	2731149	Sequence	CAG TCC CAG ACT CTT CCA GC							
108	80 8.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	NED	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6893	10 nmol
	2731150	Sequence	GCT GCG GAT TGG TCA AGA AC							
138	90 9.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	VIC	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6836	10 nmol
	2731151	Sequence	CTG GCT GTC AAC CTG TGG AA							
444	100 10.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	VIC	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6895	10 nmol
	2731152	Sequence	ATG ACT CAG GTG AAG CAG GC							
264	110 11.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	NED	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6859	10 nmol
	2731153	Sequence	TGG TCA TGC ATG CGG TAC AT							
211	120 12.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	PET	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	7075	10 nmol
	2731154	Sequence	CTA GAC GAG CAG CAC TGG AG							
455	130 13.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	NED	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6915	10 nmol
	2731155	Sequence	TGT ATG ACG CTG GTT GGA GC							
474	140 14.1	450007	AB PRISM Primer, 10nmol	PET	Yes	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	20	6994	10 nmol
	2731156	Sequence	AAC ACT GAC CAT GTG ACG CA							

Рисунок Б.1 – Данные синтеза олигонуклеотидов



Рисунок Б.2 - Синтезированные олигонуклеотиды с индивидуальными флуоресцентными метками



Рисунок Б.3 - Первичные данные (raw data) образцов At30350-At30352 в формате FSA, общий обзор аллелей

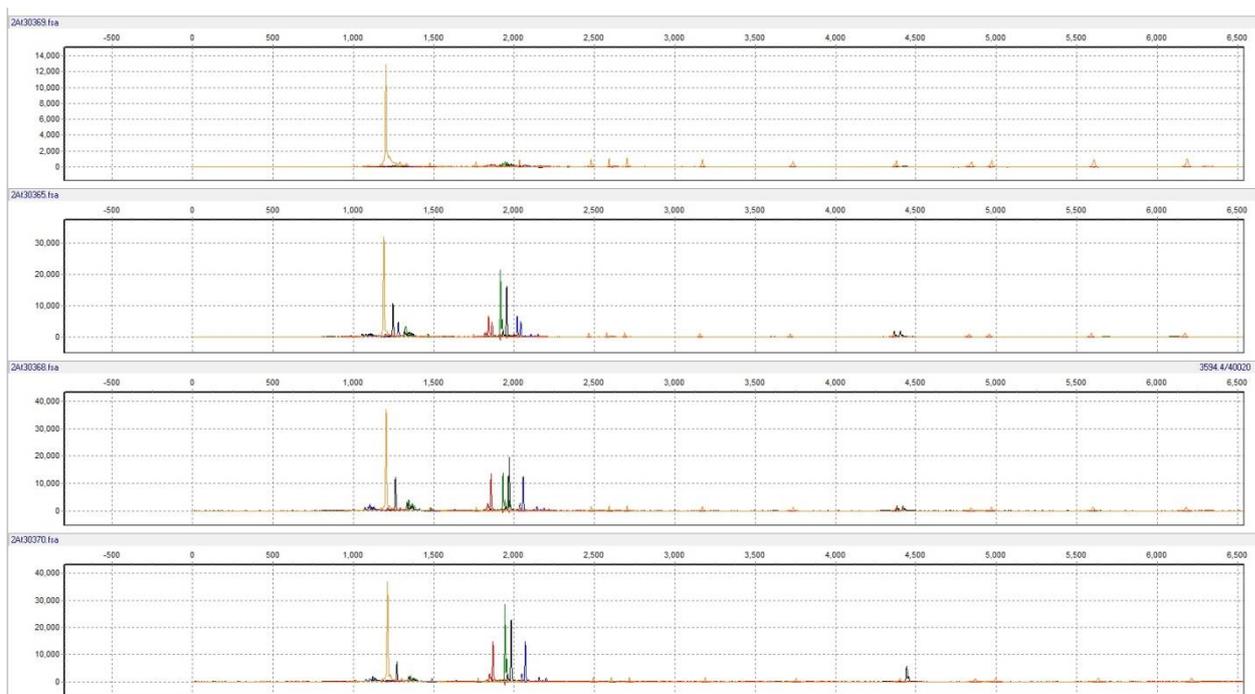


Рисунок Б.4 - Первичные данные (raw data) образцов At30365-At30370 в формате FSA, общий обзор аллелей



Рисунок Б.5 - Первичные данные (raw data) образцов At30376-At30379 в формате FSA, общий обзор аллелей

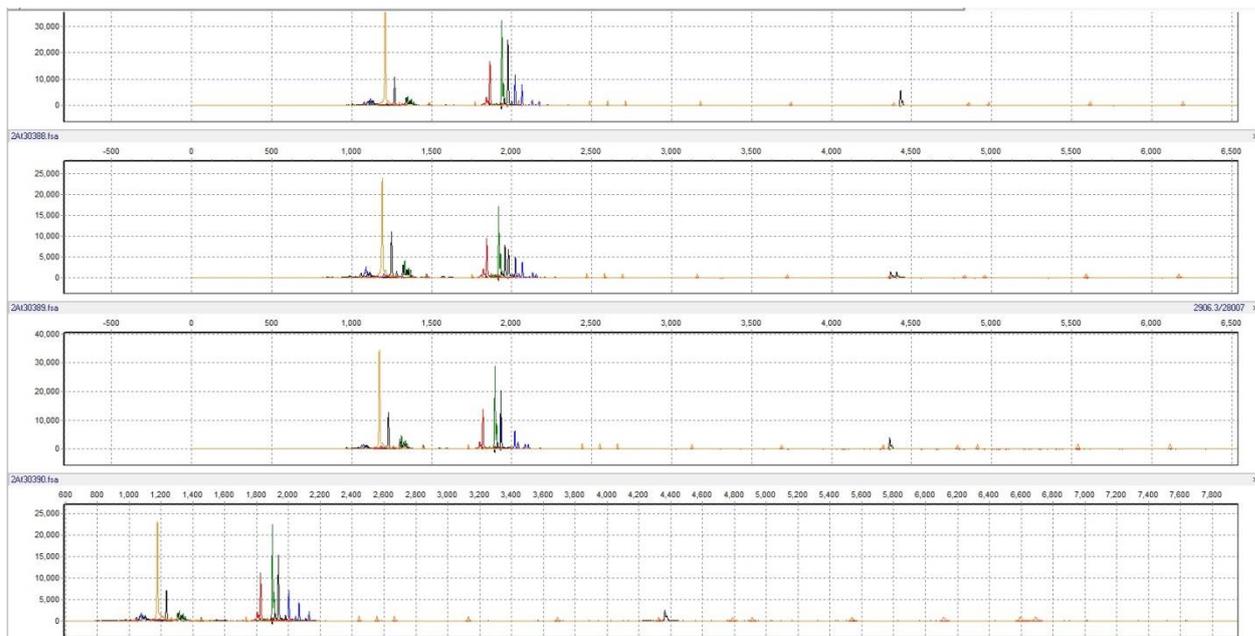


Рисунок Б.6 - Первичные данные (raw data) образцов At30387-At30390 в формате FSA, общий обзор аллелей

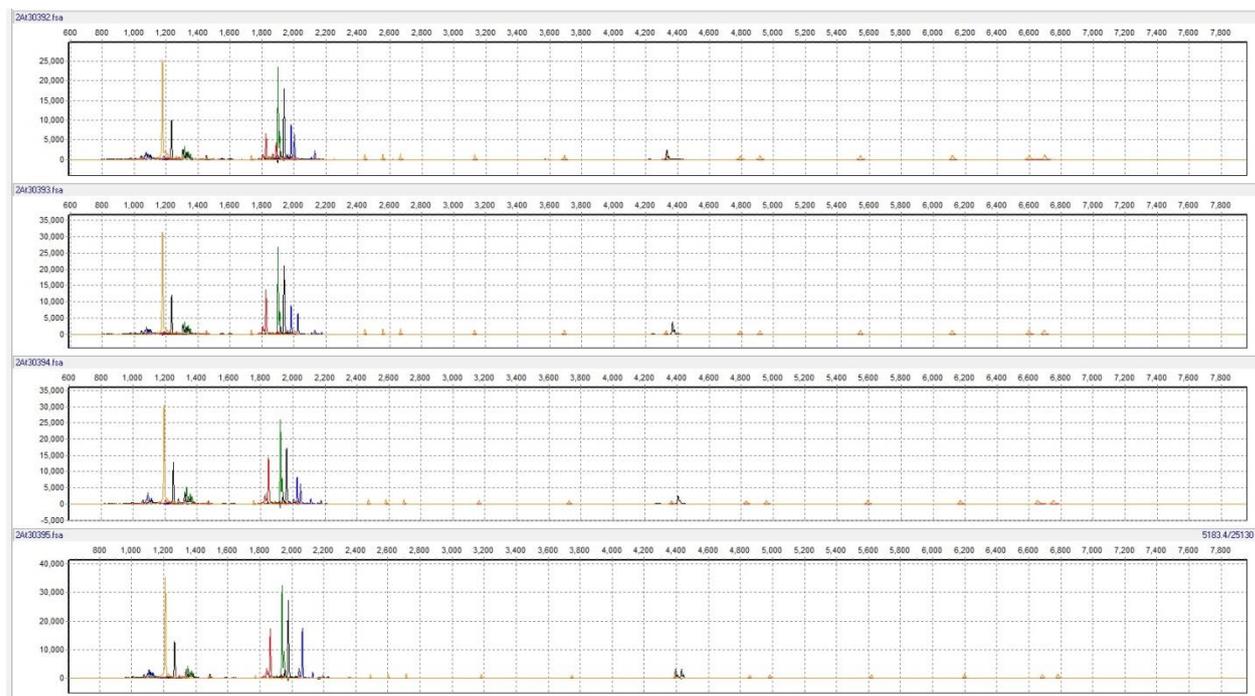


Рисунок Б.7 - Первичные данные (raw data) образцов At30392-At30395 в формате FSA, общий обзор аллелей

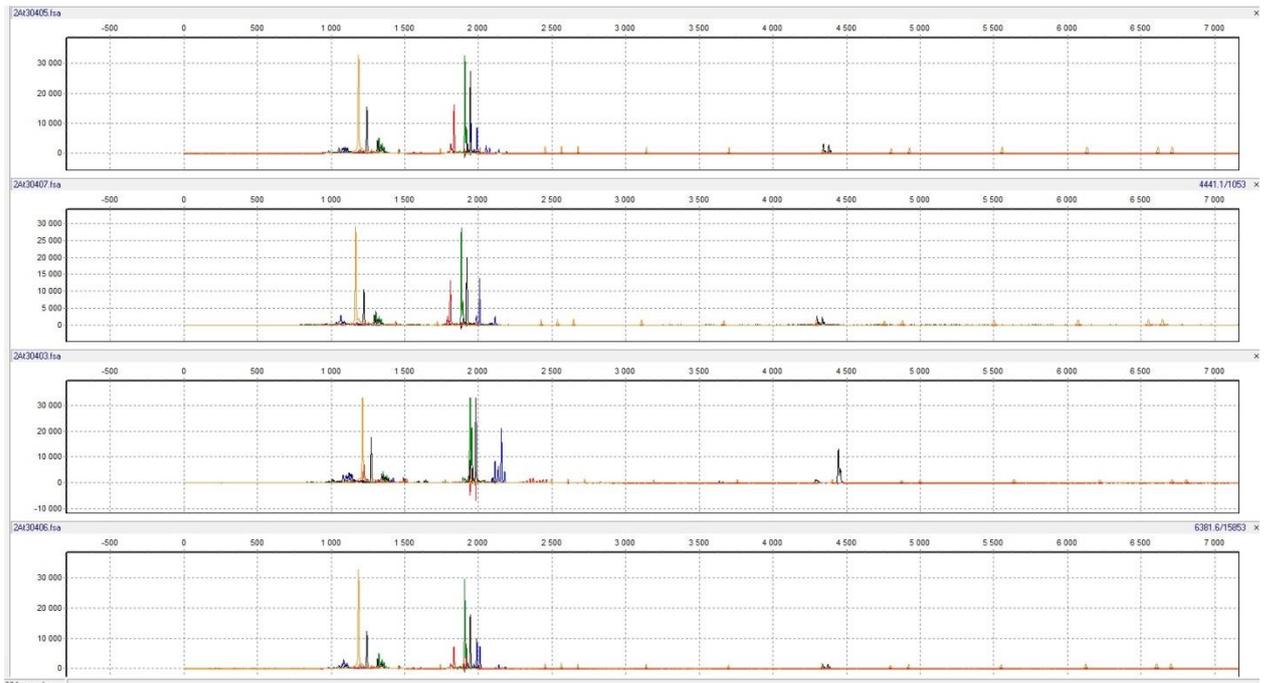


Рисунок Б.8 - Первичные данные (raw data) образцов At30405-At30408 в формате FSA, общий обзор аллелей

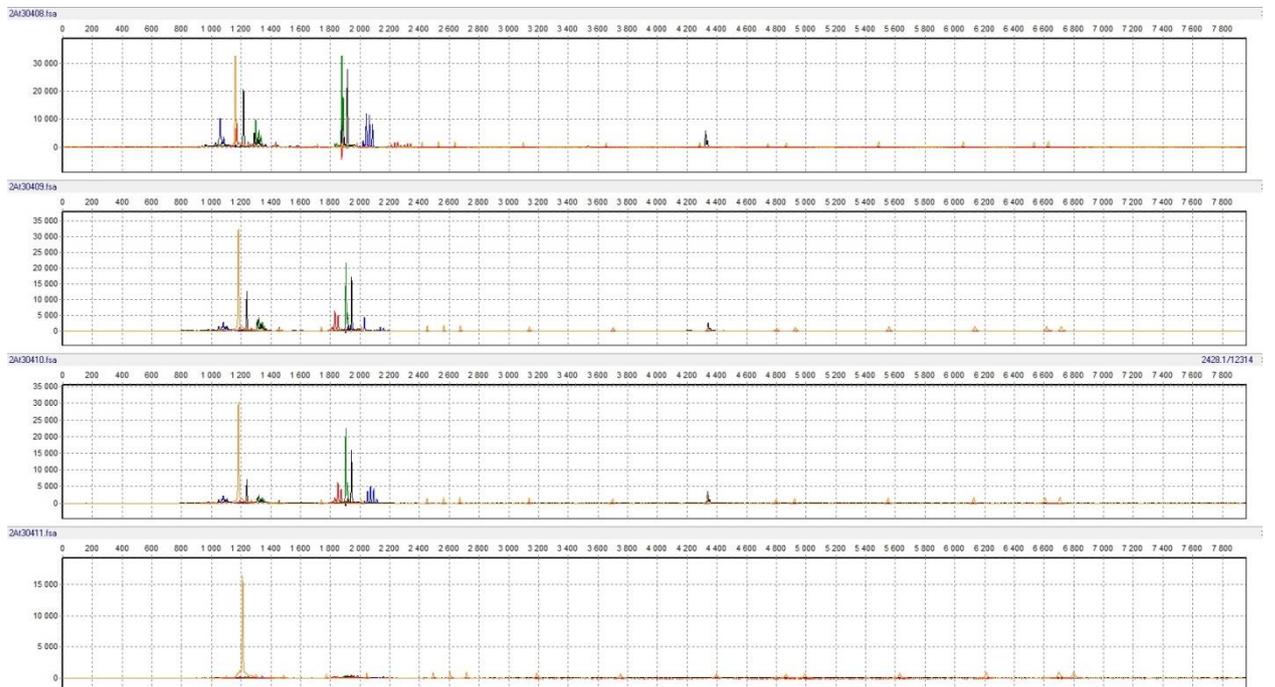


Рисунок Б.9 - Первичные данные (raw data) образцов At30409-At30412 в формате FSA, общий обзор аллелей

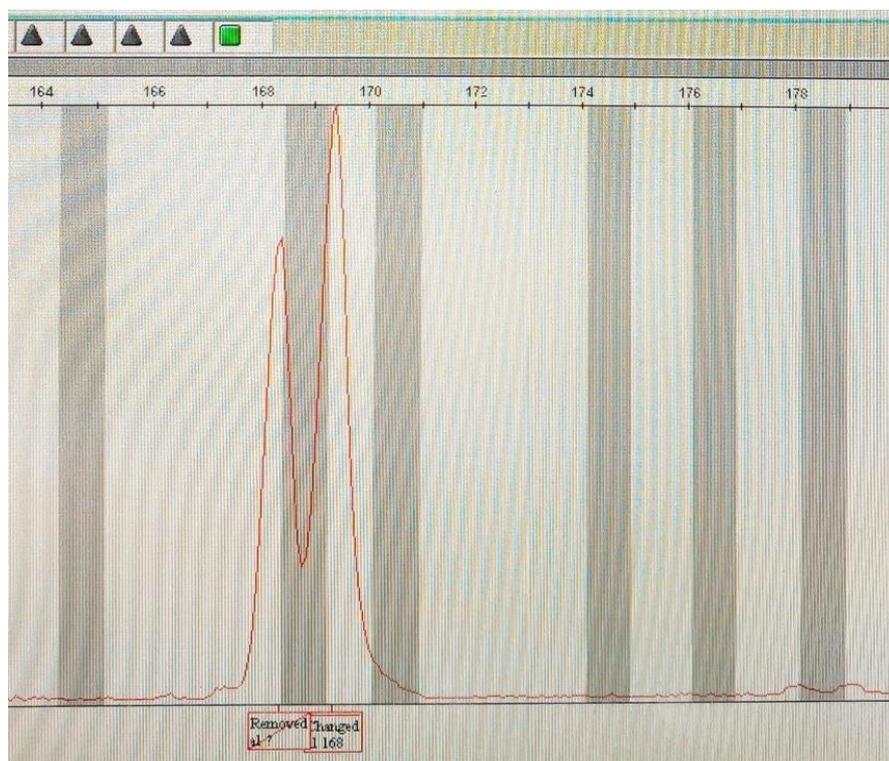


Рисунок Б.10 – Первичные данные (raw data) в формате FSA, поиск аллелей в программном обеспечении GENEMAPPER 3.7 Applied Biosystems

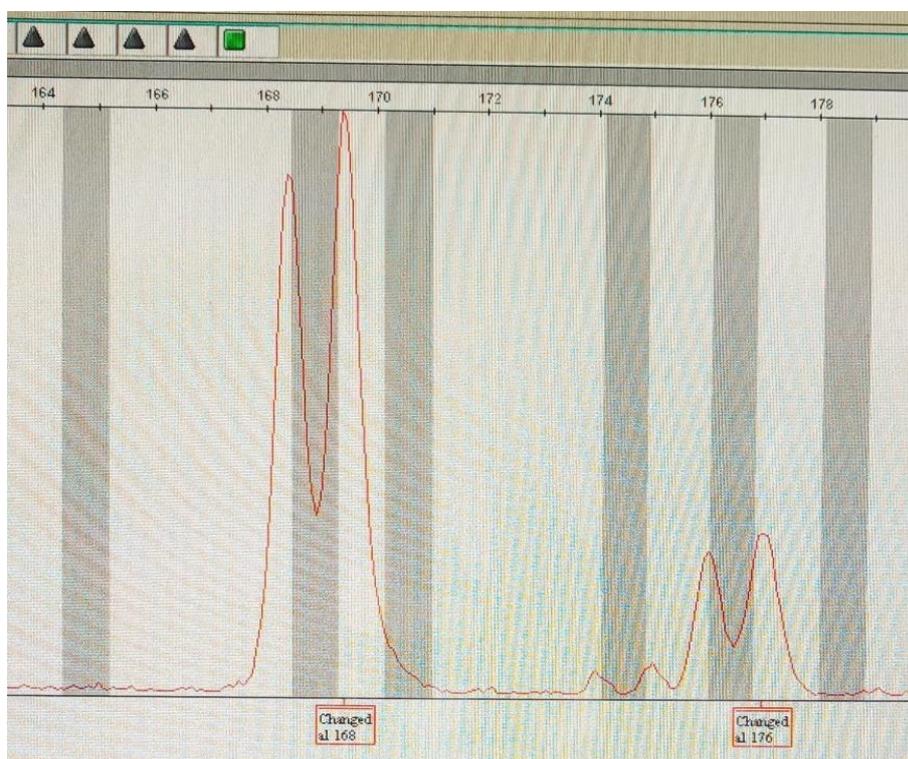


Рисунок Б.11 – Первичные данные (raw data) в формате FSA, поиск нескольких аллелей в программном обеспечении GENEMAPPER 3.7 Applied Biosystems

File: 21BBSAB005_A01_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1127 A:2895 C:5465 T:3692

Sample: 21BBSAB005_A01_premix Lane: 15 Base spacing: 15.650213 1360 bases in 16394 scans Page 2 of 2

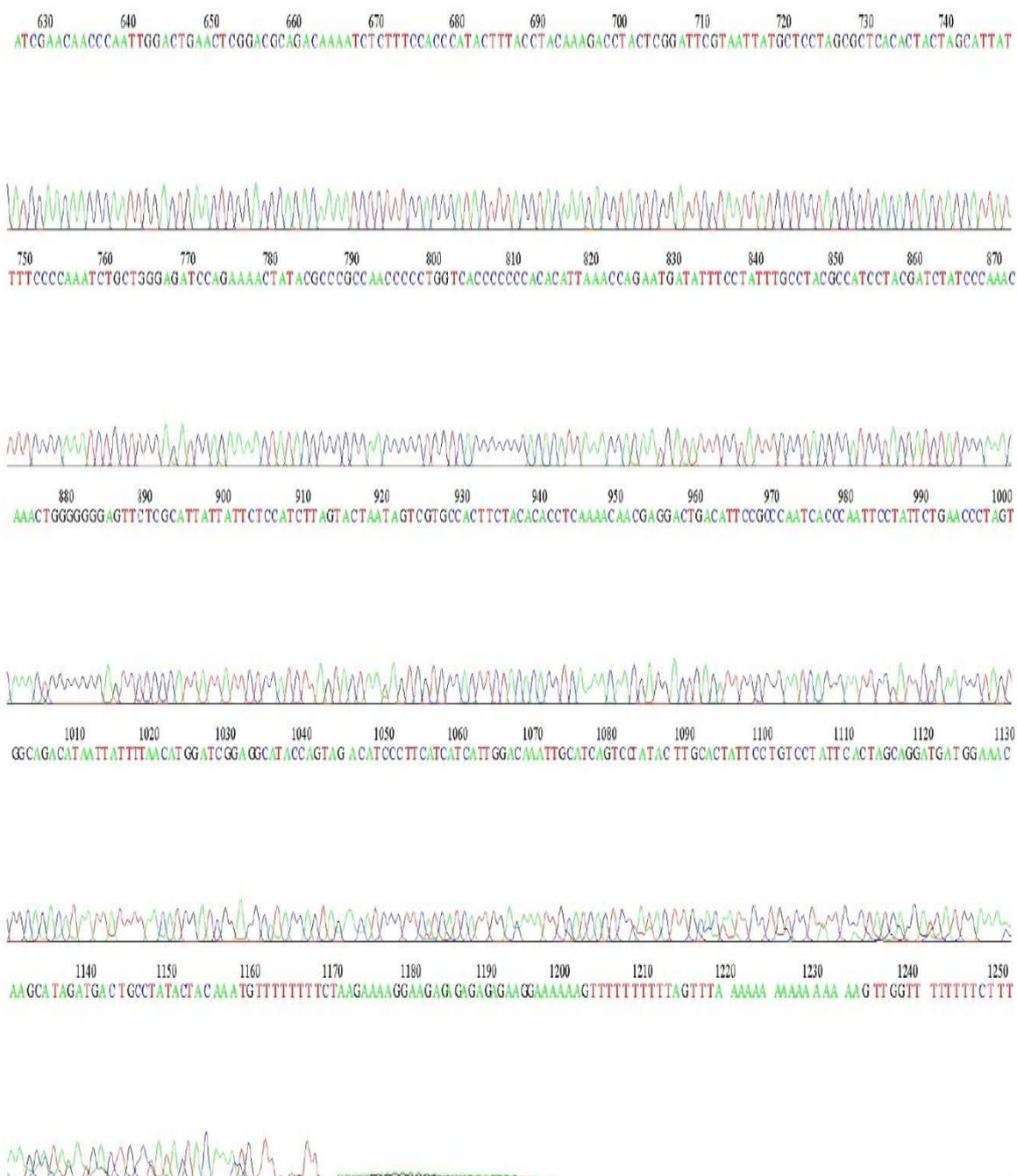


Рисунок В.2 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 2) образца А01



Рисунок В.3 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца В01

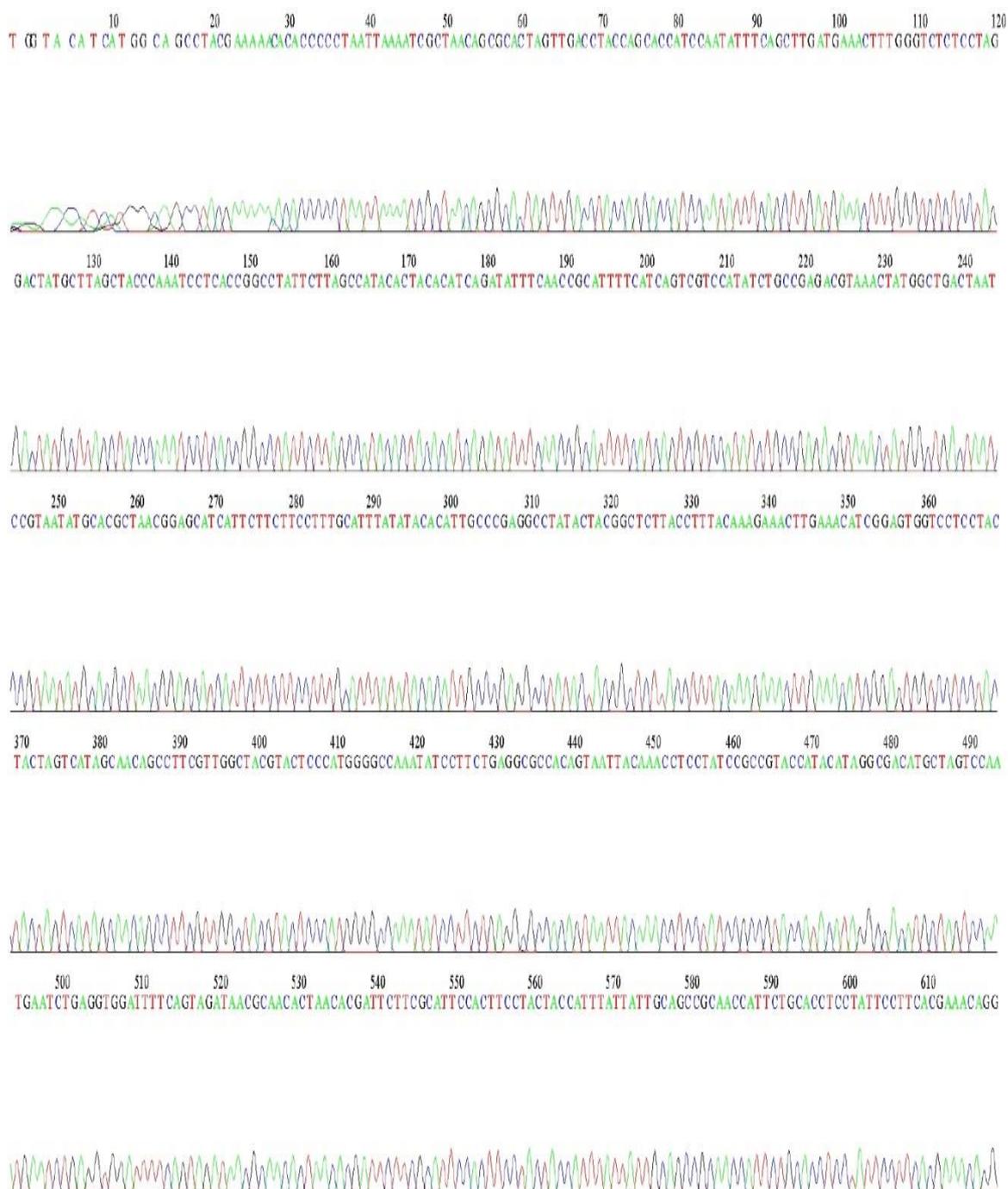


Рисунок В.5 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца С03

File: 21BBSAB005_D05_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1197 A:2904 C:5850 T:3704
 Sample: 21BBSAB005_D05_premix Lane: 41 Base spacing: 15.458625 1518 bases in 18441 scans Page 1 of 2

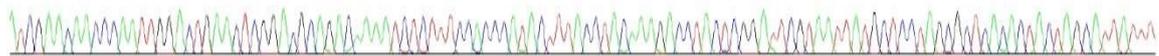


Рисунок В.7 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца D05

File: 21BBSAB005_D05_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1197 A:2904 C:5850 T:3704

Sample: 21BBSAB005_D05_premix Lane: 41 Base spacing: 15.458625 1518 bases in 18441 scans Page 2 of 2

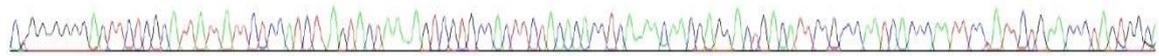
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
ATCGAACAAACCCAAATTGGACTGAACTCGGACGCAGACAAAATCTCTTTCCACCCATACTTTACCTACAAAGACCTACTCGGATTGGTAAATATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCATTATTT



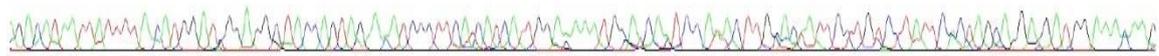
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
TCCCCAAATCTGCTGGGAGATCCAGAAAACTATACGCCCCAAACCCCTGGTACCCCCCACACATTAAAACAAGGATATTTCCATATTTGCTACGCCATCCTACGATCTATCCCAAACAAA



870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
CTGGGGGGAGTTCTCGCATATTATTCTCCATCTTAGTACTAAAAGTCTGTCACCTTCTACACACCTCAAAACAAAGGACTGACATCCGCCAATCACCCAAATCCTATTCTGAACCCCTAGTGGC



1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
AGACATAATATTTACATGGATCGAGGATACCAAGTAGACATCCCTTCATCATTGGACAAATGCATCAGTCCATACCTTGCACTATTCCCTGCTATTCACTAGCAGGAGGATGGAAACAAAG



1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
CCTAGAGACTGCCATCTACACGAAAAATAAAAAAGATAAGAAAGATAGAGAAAAAGAGGGGGGGGGAGGGGGAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAGTGGTTTTT

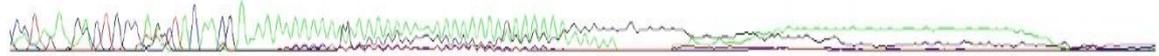


Рисунок В.8 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 2) образца D05

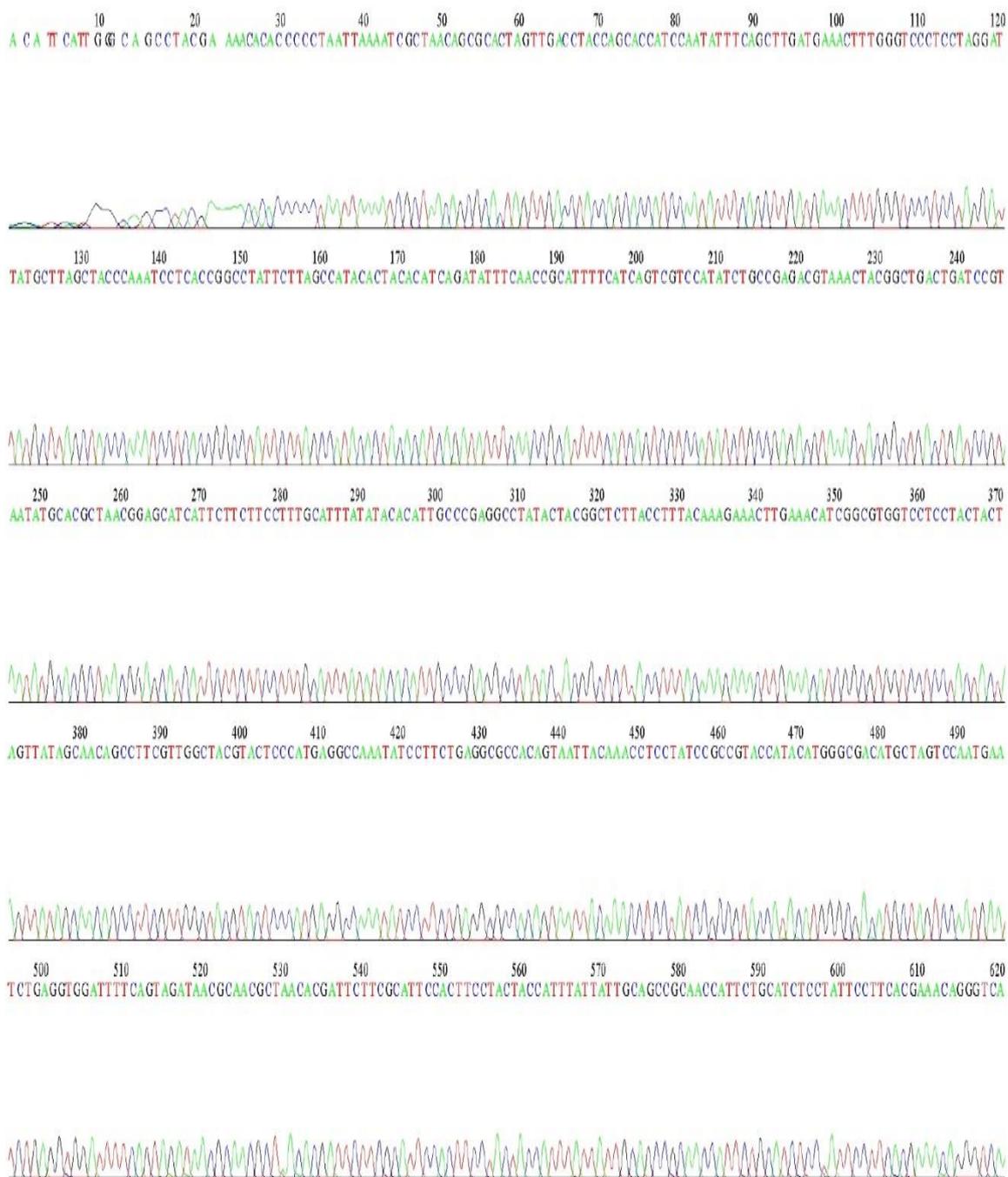


Рисунок В.9 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца F06

File: 21BBSAB005_G01_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1902 A:5165 C:10801 T:7445
 Sample: 21BBSAB005_G01_premix Lane: 3 Base spacing: 15.765043 1374 bases in 16514 scans Page 1 of 2



Рисунок В.11 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца G01

File: 21BBSAB005_G01_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1902 A:5165 C:10801 T:7445
 Sample: 21BBSAB005_G01_premix Lane: 3 Base spacing: 15.765043 1374 bases in 16514 scans Page 2 of 2

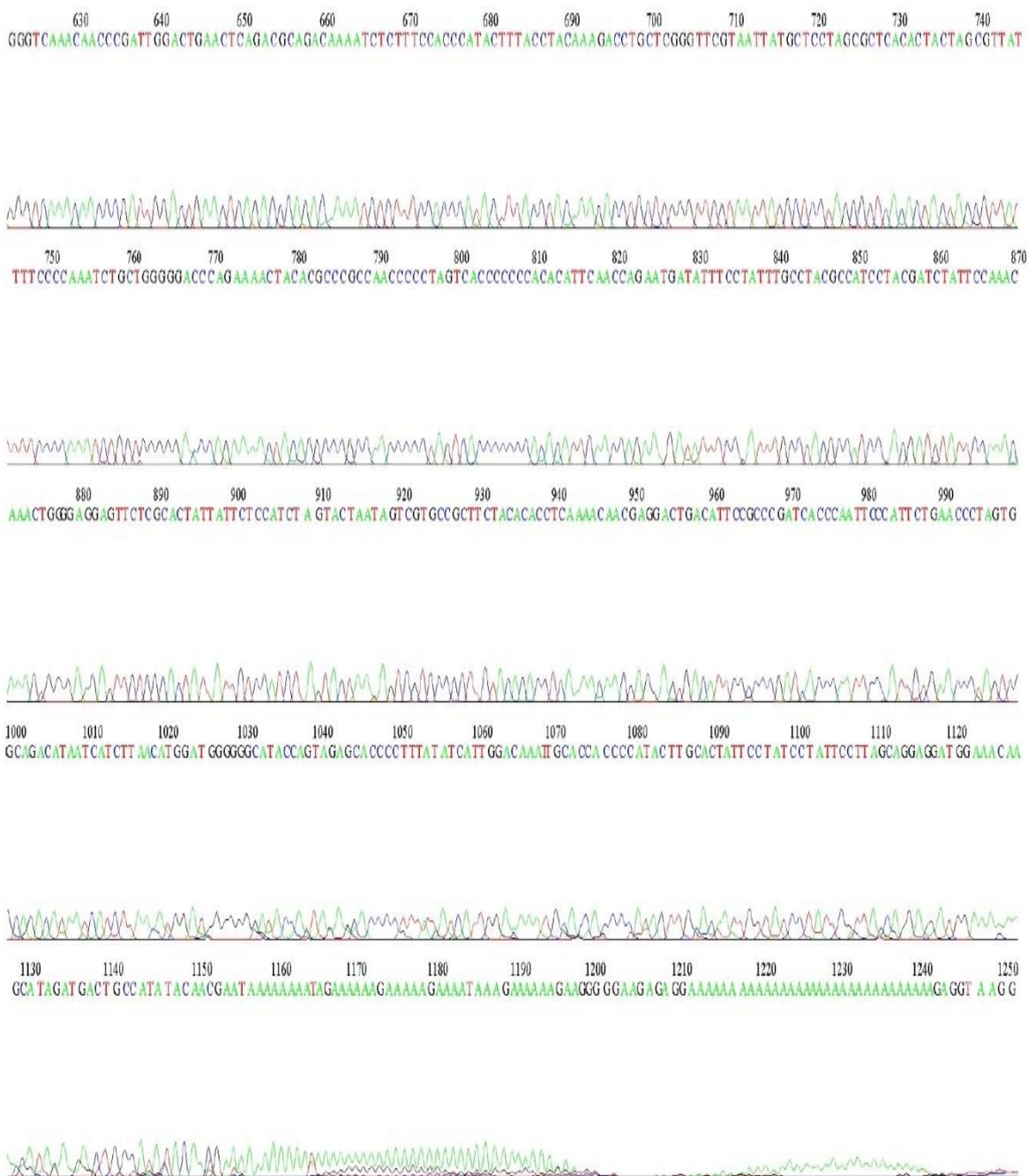


Рисунок В.12 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 2) образца G01

File: 21BBSAB005_H11_premit.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1616 A:3105 C:3351 T:4947
 Sample: 21BBSAB005_H11_premit Lane: 81 Base spacing: 15.791873 1344 bases in 16051 scans Page 1 of 2

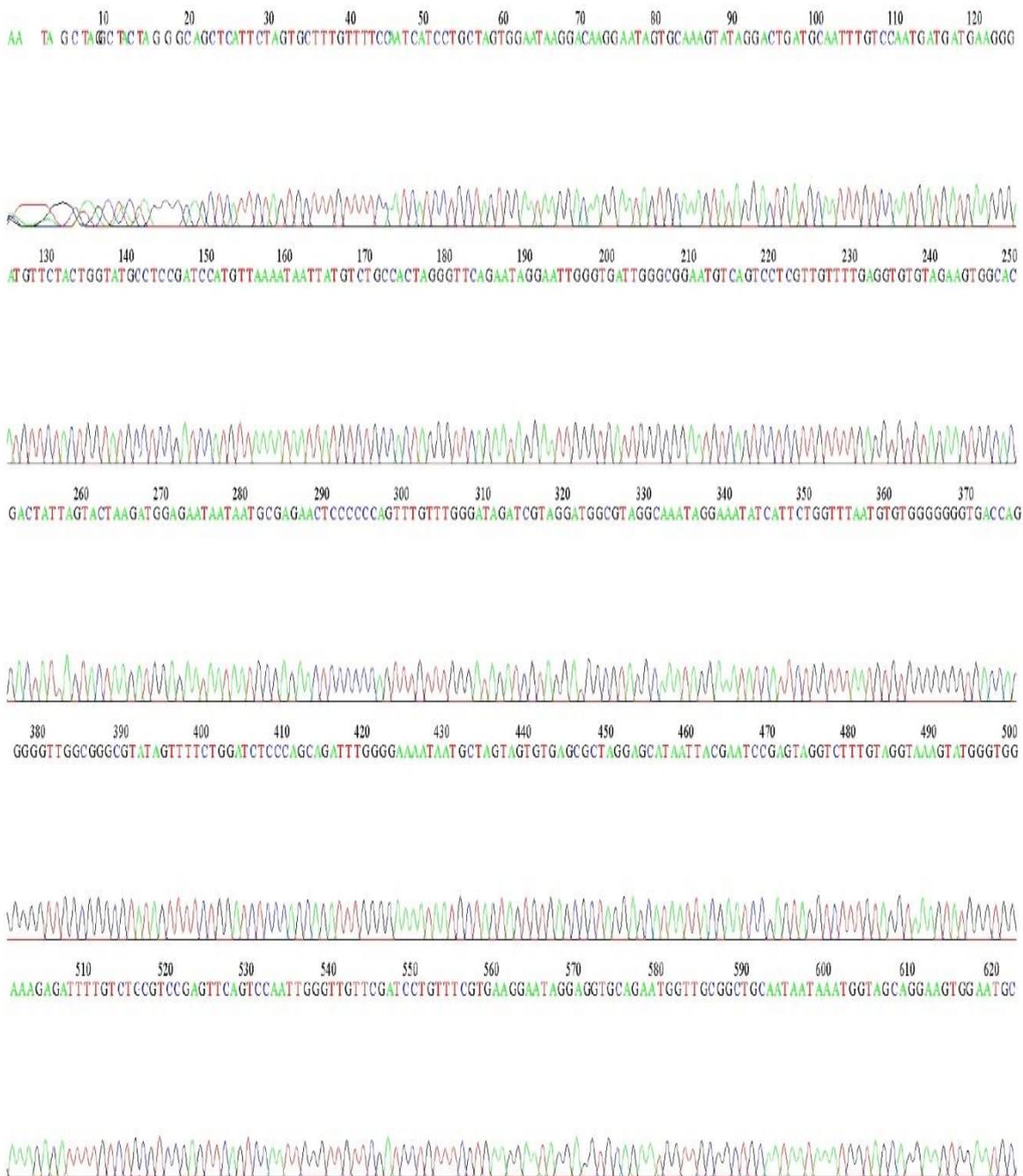


Рисунок В.13 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 1) образца H11

File: 21BBSAB005_H11_premix.ab1 Run Ended: 2022/11/19 18:54:16 Signal G:1616 A:3105 C:3351 T:4947

Sample: 21BBSAB005_H11_premix Lane: 81 Base spacing: 15.791873 1344 bases in 16051 scans Page 2 of 2

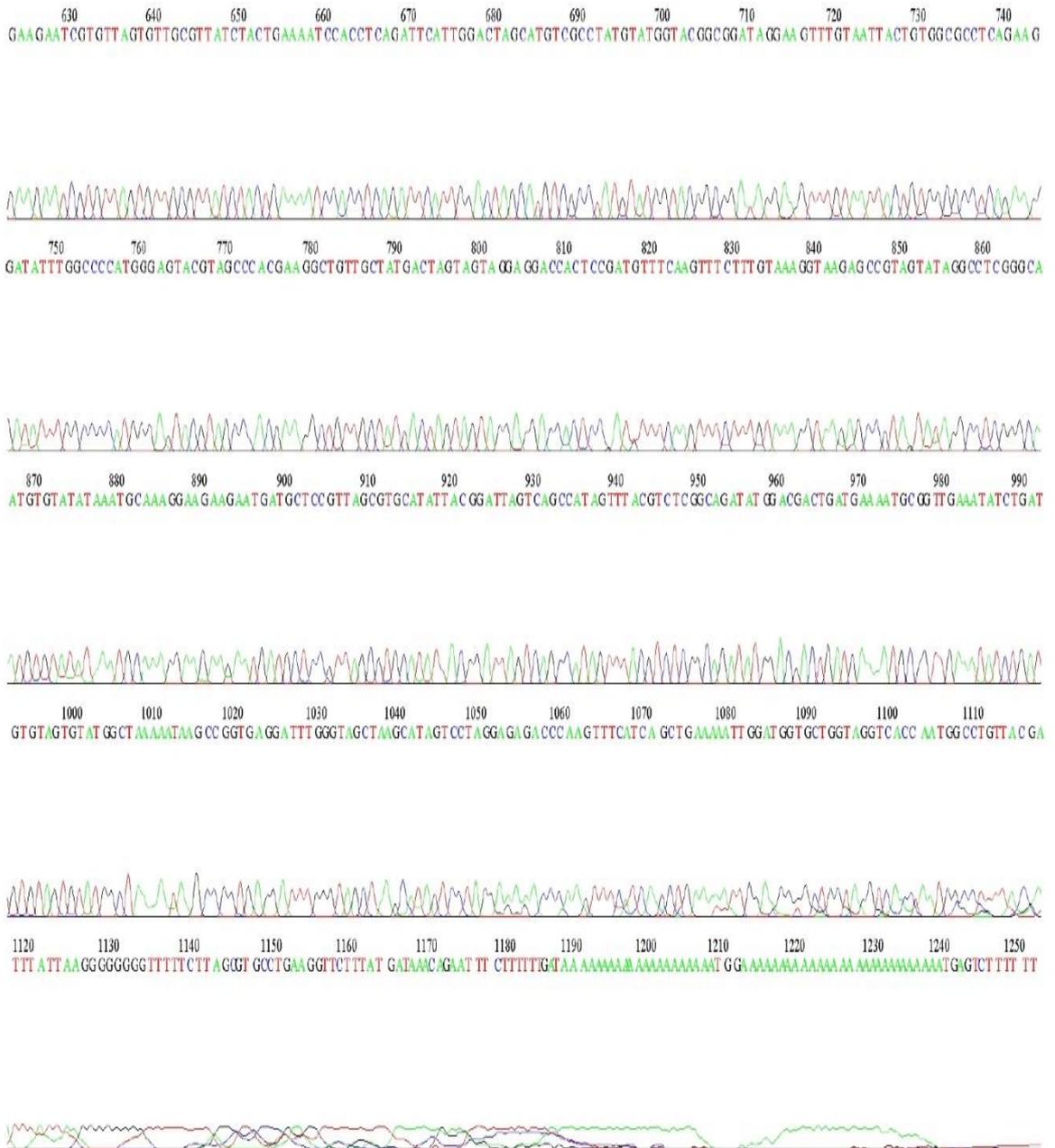


Рисунок В.14 – Результаты секвенирования гена *Cytb* (формат AB1, часть 2) образца H11

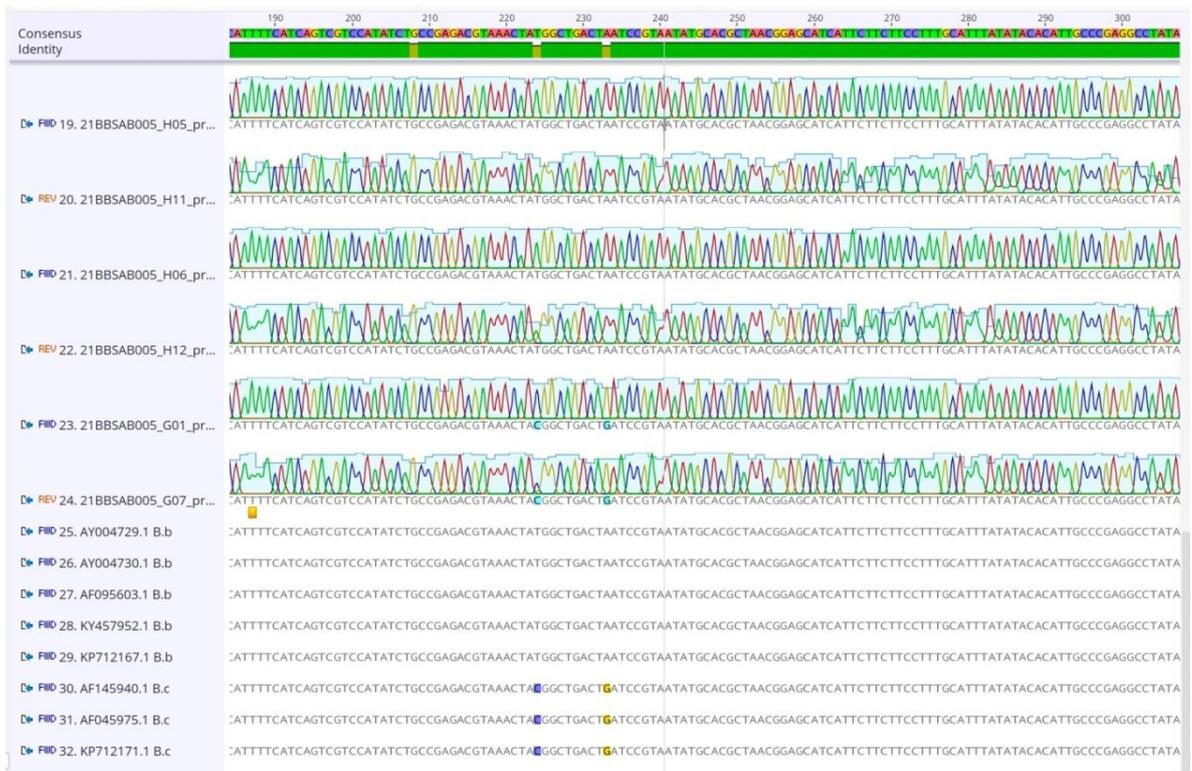


Рисунок В.15 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 190-300 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2.2 (формат файлов AB1)



Рисунок В.16 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 350-460 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2.2 (формат файлов AB1)

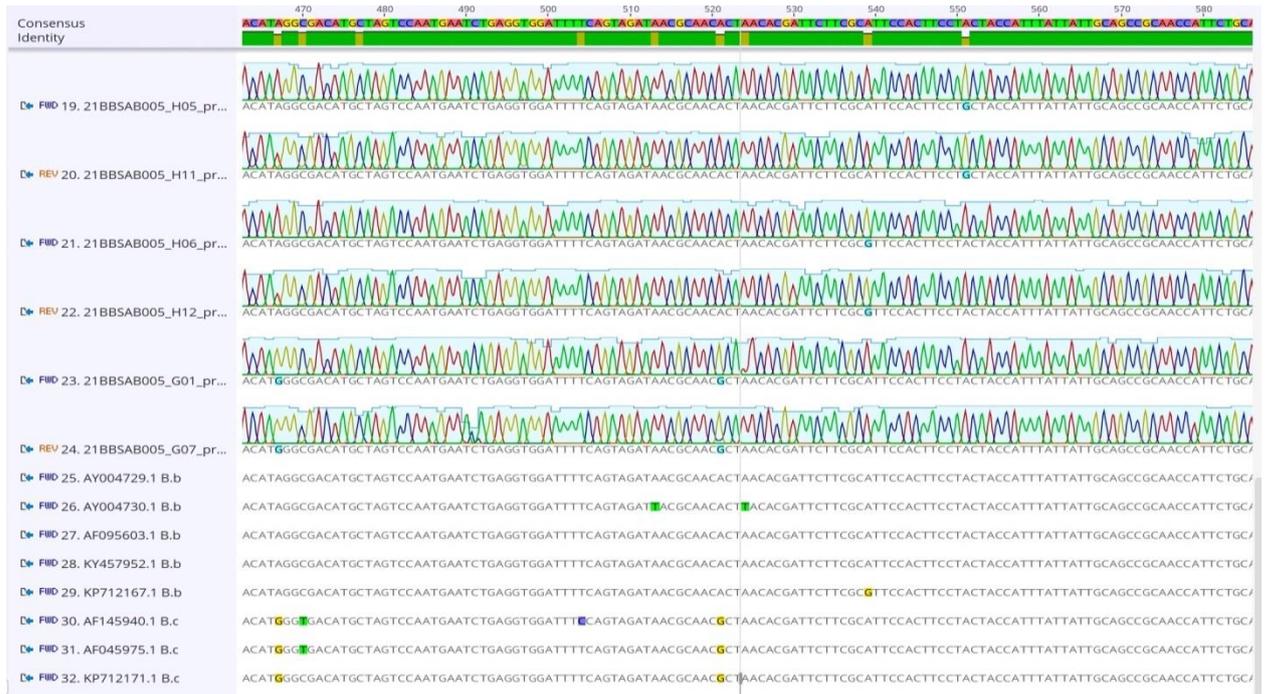


Рисунок В.17 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 470-580 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2 (формат файлов AB1)

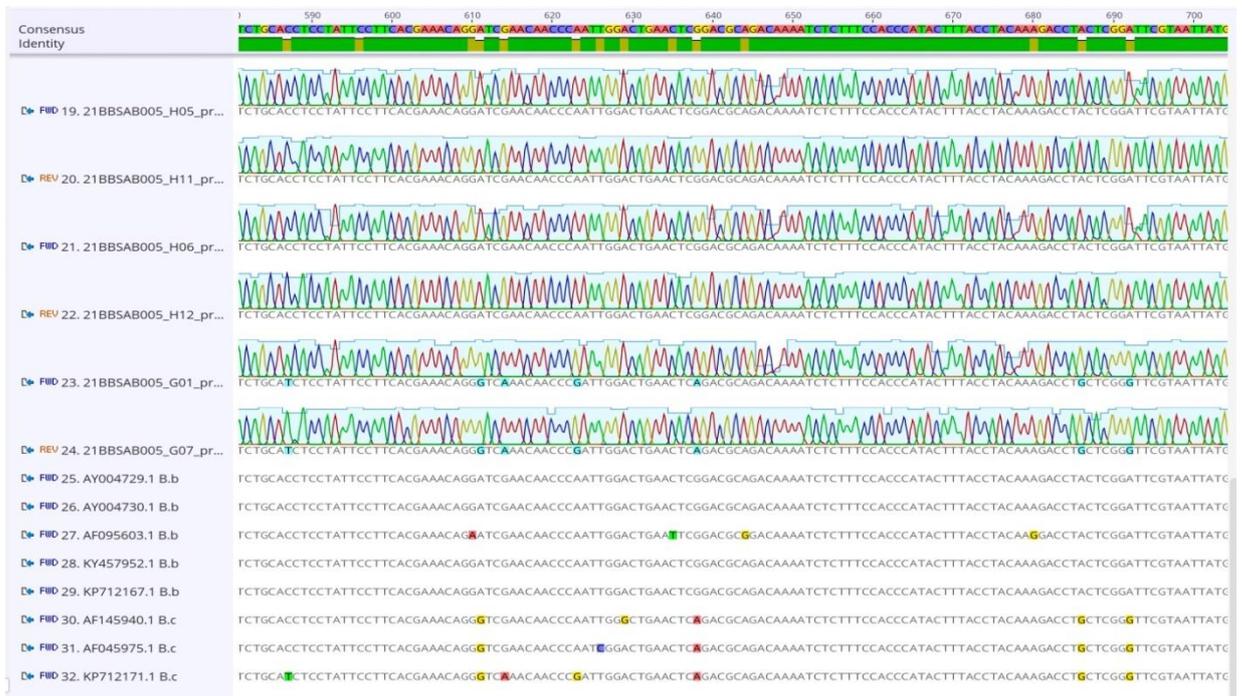


Рисунок В.18 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 590-700 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2 (формат файлов AB1)

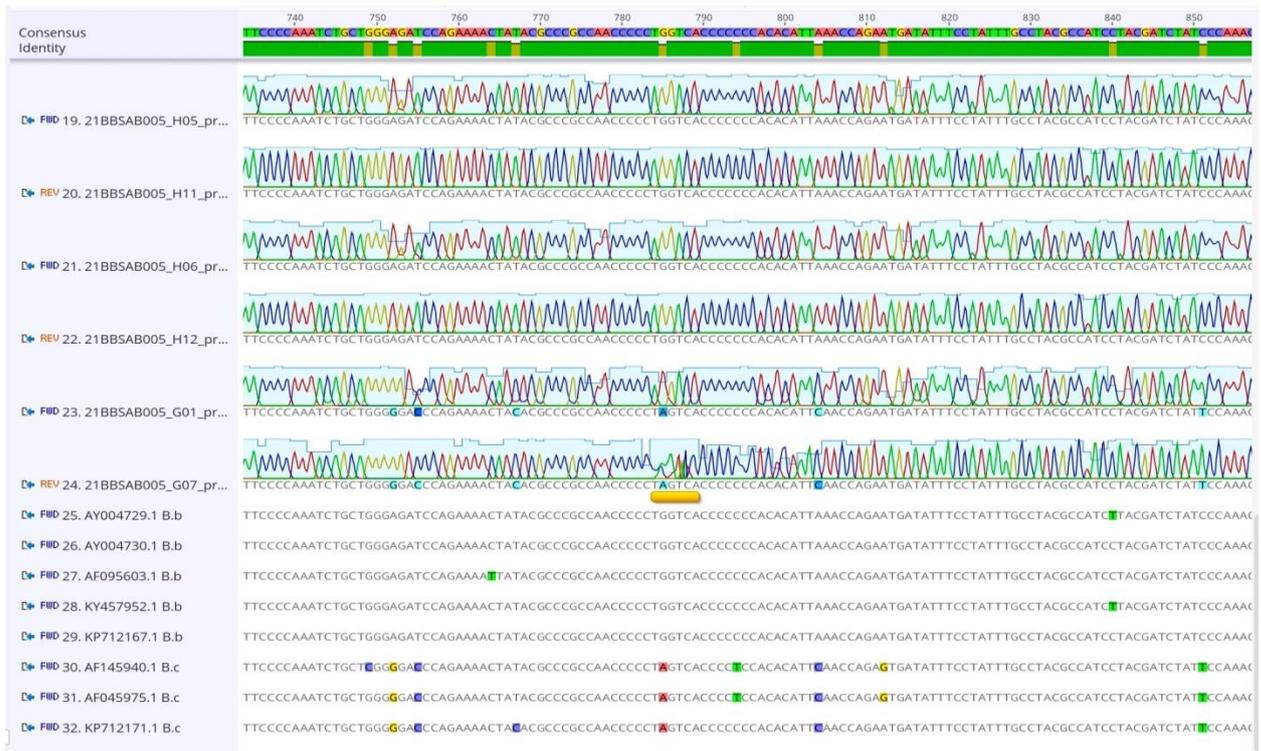


Рисунок В.19 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 740-850 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2 (формат файлов AB1)

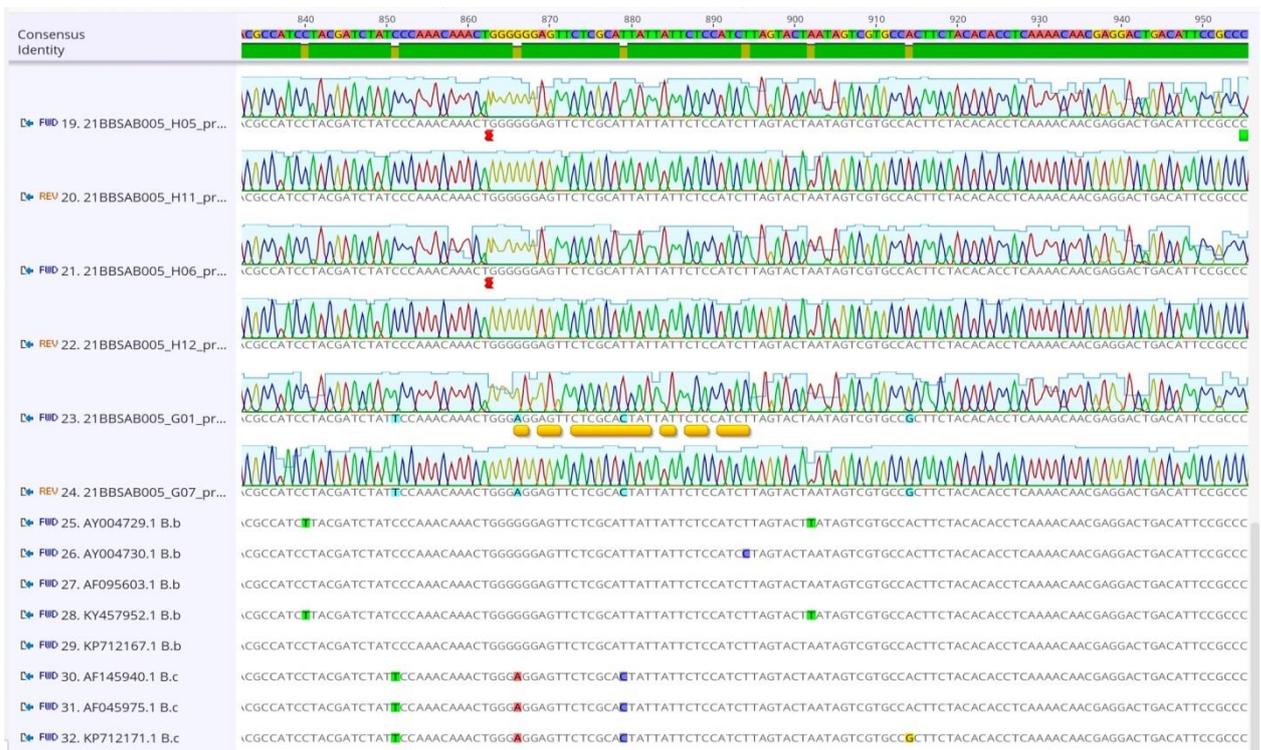


Рисунок В.20 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 840-950 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2 (формат файлов AB1)

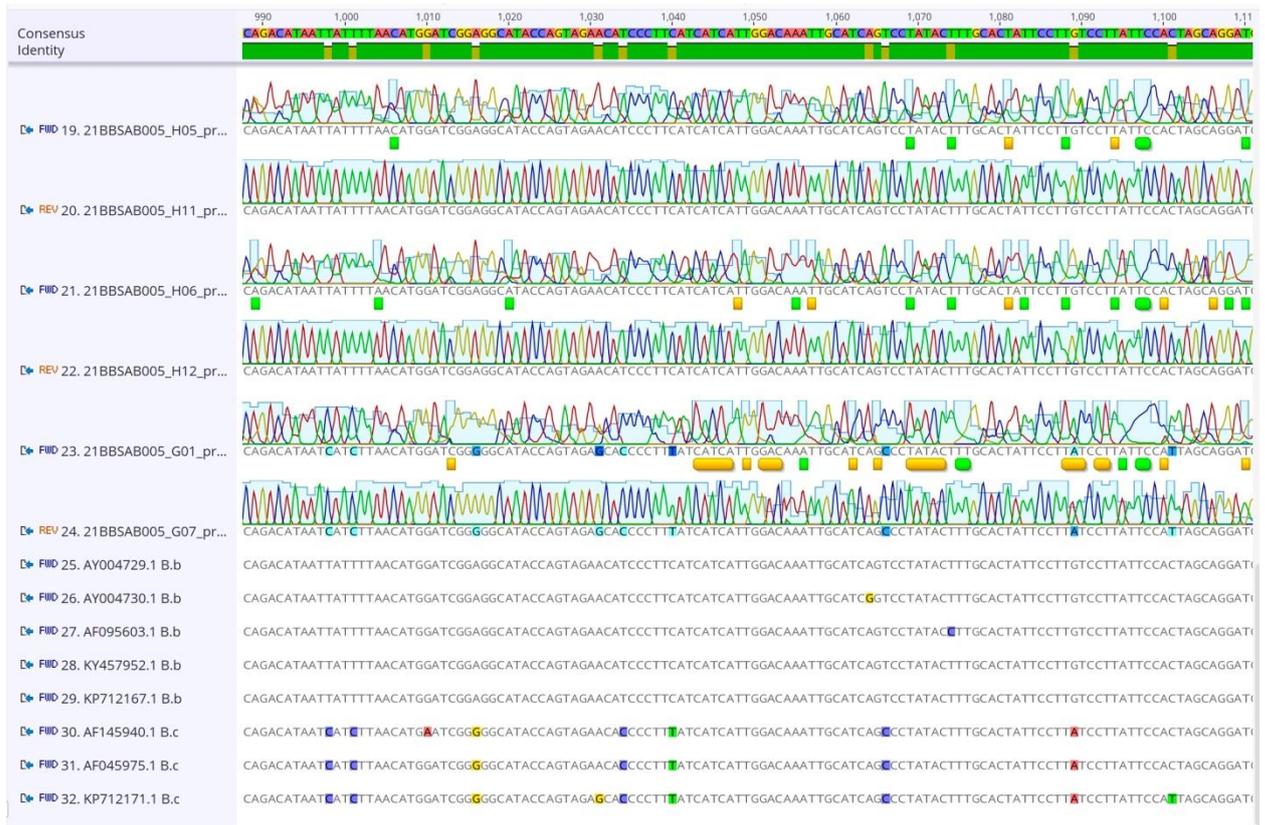


Рисунок В.21 - Сравнение консенсусной идентичности (участок 990-1110 нуклеотидов) выровненных последовательностей собственных образцов с данными базы *NCBI* в программе Geneious V.2022.2.2 (формат файлов AB1)

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Полученные нуклеотидные последовательности усачей рода *Luciobarbus* Heckel, 1843 Арало-Сырдарьинского бассейна

Таблица Г.1 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus brachycephalus* (21BBSAB005_E01) из Арало-Сырдарьинского бассейна

Номер, вид	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
>21BBSAB005_E01 <i>Luciobarbus</i> <i>brachycephalus</i>	TGGCAAGCCTACGAAAAACACCCCCCTAATTAA AATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGCA CCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGTC TCTCCTAGGACTATGCTTAGCTACCCAAATCCTCA CCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGAT ATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCATATCTG CCGAGACGTAAACTATGGCTGACTAATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACSTTTACAAAGAAACTTGAAACATCGGA GTGGTCCTCCTACTACTAGTCATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGGGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATAGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC ACTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCCTGCTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCACCTC СТАТТСТТТАСГАААСАГГАТСГААААСССААТ TGGACTGAACTCGGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTACTCGGATTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCATT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGAGATCCAGAAAAC ATACGCCCGCCAACCCCTGGTCACCCCCCACAC ATTAACCAGAATGATATTTCTATTGCTACGC CATCCTACGATCTATCCCAAACAACCTGGGGGGA GTTCTCGCATTATTATTCTCCATCTTAGTACTAATA GTCGTGCCACTTCTACACACCTCAAAACAACGAG GACTGACATTCCGCCCAATACCCAATTCTATTC TGAACCCTAGTGGCAGACATAGTTATTTAACATG GATCGGAGGCATACCAGTAGAACATCCCTTCATC ATCATTTGGACAAATTGCATCAGTCCTATACTTTGC ACTATTCCTTGTCCTTATTCCTACTAGCAGGATGAT TGGA

Таблица Г.2 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus brachycephalus* (21BBSAB005_E02) из Арало-Сырдарьинского бассейна

<p>>21BBSAB005_E02 <i>Luciobarbus brachycephalus</i></p>	<p>TGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCCCTAATTAA AATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGCA CCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGTC TCTCCTAGGACTATGCTTAGCTACCCAAATCCTCA CCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGAT ATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCATATCTG CCGAGACGTAAACTATGGCTGACTAATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACCTTTACAAAGAACTTGAAACATCGGA GTGGTCCTCCTACTACTAGTCATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGGGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATAGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC ACTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCCTGCTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCACCTC СТАТТCCTTCACGAAACAGGATCGAACAACCCAAT TGGACTGAACTCGGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTACTCGGATTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCATT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGAGATCCAGAAAAT ATACGCCC GCCAACCCCTGGTCACCCCCCACAC ATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTGCTACGC CATCCTACGATCTATCCCAAACAAACTGGGGGGA GTTCTCGCATTATTATTCTCCATCTTAGTACTAATA GTCGTGCCACTTCTACACACCTCAAAACAACGAG GACTGACATTCCGCCCAATCACCCAATTCCTATTC TGAACCCTAGTGGCAGACATAATTATTTAACATG GATCGGAGGCATACCAGTAGAACATCCCTTCATC ATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCTATACTTTGC ACTATTCCTTGTCTTATTCCACTAGCAGGATGAT TGGA</p>
---	---

Таблица Г.3 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus brachycephalus* (21BBSAB005_F01) из Арало-Сырдарьинского бассейна

<p>>21BBSAB005_F01 <i>Luciobarbus brachycephalus</i></p>	<p>TGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCCCTAATTAA AATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGCA CCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGTC TCTCCTAGGACTATGCTTAGCTACCCAAATCCTCA CCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGAT ATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCATATCTG CCGAGACGTAAACTATGGCTGACTAATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACCTTTACAAAGAACTTGAAACATCGGA GTGGTCCTCCTACTACTAGTCATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGGGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATAGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC ACTAACACGATTCTTCGCGTTCCACTTCCTACTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCACCTC СТАТТCCTTCACGAAACAGGATCGAACAACCCAAT TGGACTGAACTCGGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTACTCGGATTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCATT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGAGATCCAGAAAAT ATACGCCC GCCAACCCCTGGTCACCCCCCACAC ATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTGCTACGC CATCCTACGATCTATCCCAAACAAACTGGGAGGA GTTCTCGCATTATTATTCTCCATCTTAGTACTAATA GTCGTGCCACTTCTACACACCTCAAAACAACGAG GACTGACATTCCGCCCAATCACCCAATTCCTATTC TGAACCCTAGTGGCAGACATAATTATTTAACATG GATCGGAGGCATACCAGTAGAACATCCCTTCATC ATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCTATACTTTGC ACTATTCCTTGTCTTATTCCACTAGCAGGATGAT TGGA</p>
---	---

Таблица Г.4 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus brachycephalus* (21BBSAB005_F05) из Арало-Сырдарьинского бассейна

<p>>21BBSAB005_F05 <i>Luciobarbus brachycephalus</i></p>	<p>TGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCCCTAATTAA AATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGCA CCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGTC TCTCCTAGGACTATGCTTAGCTACCCAAATCCTCA CCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGAT ATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCATATCTG CCGAGACGTAAACTATGGCTGACTAATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACCTTTACAAAGAACTTGAAACATCGGA GTGGTCCTCCTACTACTAGTCATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGGGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATAGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC ACTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCCTGCTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCACCTC СТАТТТCTTCACGAAACAGGATCGAACAACCCAAT TGGACTGAACTCGGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTACTCGGATTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCATT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGAGATCCAGAAAAT ATACGCCC GCCAACCCCTGGTCACCCCCCACAC ATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTGCTACGC CATCCTACGATCTATCCCAAACAAACTGGGGGGA GTTCTCGCATTATTATTCTCCATCTTAGTACTAATA GTCGTGCCACTTCTACACACCTCAAAACAACGAG GACTGACATTCCGCCCAATCACCCAATTCCTATTC TGAACCCTAGTGGCAGACATAATTATTTAACATG GATCGGAGGCATACCAGTAGAACATCCCTTCATC ATCATTGGACAAATTGCATCAGTCCTATACTTTGC ACTATTCCTTGTCTTATTCCACTAGCAGGATGAT TGGA</p>
---	---

Таблица Г.5 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus conocephalus* (21BBSAB005_F06) из Арало-Сырдарьинского бассейна

<p>>21BBSAB005_F06 <i>Luciobarbus conocephalus</i></p>	<p>TGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCCCTAATTAA AATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGCA CCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGTC CCTCCTAGGATTATGCTTAGCTACCCAAATCCTCA CCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGAT ATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCCATATCTG CCGAGACGTAAACTACGGCTGACTGATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACCTTTACAAAGAACTTGAAACATCGGC GTGGTCCTCCTACTACTAGTTATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGAGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATGGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC GCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCCTACTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCATCTC СТАТТCCTTCACGAAACAGGGTCAAACAACCCGAT TGGACTGAACTCAGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTGCTCGGGTTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCGTT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGGGACCCAGAAAAC ACACGCCCGCCAACCCCTAGTCACCCCCCACAC ATTCAACCAGAATGATATTTCCCTATTTGCCTACGC CATCCTACGATCTATTCCAAACAAACTGGGAGGA GTTCTCGCACTATTATTCTCCATCTTAGTACTAATA GTCGTGCCGCTTCTACACACCTCAAACAACGAG GACTGACATTCCGCCCGATACCCAATTCCCTATTC TGAACCCTAGTGGCAGACATAATCATCTTAACATG GATCGGGGGCATAACCAGTAGAGCACCCCTTTATC ATCATTGGACAAATTGCATCAGCCCTATACTTTGC ACTATTCTTATCCTTATTCCATTAGCAGGATGATT GGA</p>
--	---

Таблица Г.6 Нуклеотидная последовательность *Luciobarbus conocephalus* (21BBSAB005_G01) из Арало-Сырдарьинского бассейна

>21BBSAB005_G01 <i>Luciobarbus conocephalus</i>	ATGGCAAAGCCACCAAAAACACACCCCCTAATTA AAATCGCTAACAGCGCACTAGTTGACCTACCAGC ACCATCCAATATTTTCAGCTTGATGAAACTTTGGGT CCCTCCTAGGATTATGCTTAGCTACCCAAATCCTC ACCGGCCTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGA TATTTCAACCGCATTTTCATCAGTCGTCCATATCTG CCGAGACGTAAACTACGGCTGACTGATCCGTAAT ATGCACGCTAACGGAGCATCATTTCTTCTTCCTTTG CATTTATATACACATTGCCCGAGGCCTATACTACG GCTCTTACCTTTACAAAGAACTTGAAACATCGGC GTGGTCCTCCTACTACTAGTTATAGCAACAGCCTT CGTTGGCTACGTACTCCCATGAGGCCAAATATCCT TCTGAGGCGCCACAGTAATTACAAACCTCCTATCC GCCGTACCATACATGGGCGACATGCTAGTCCAAT GAATCTGAGGTGGATTTTCAGTAGATAACGCAAC GCTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCCTACTAC CATTTATTATTGCAGCCGCAACCATTCTGCATCTC СТАТТCCTTCACGAAACAGGGTCAAACAACCCGAT TGGACTGAACTCAGACGCAGACAAAATCTCTTTCC ACCCATACTTTACCTACAAAGACCTGCTCGGGTTC GTAATTATGCTCCTAGCGCTCACACTACTAGCGTT ATTTTCCCCAAATCTGCTGGGGGACCCAGAAAAT ACACGCCCGCCAACCCCTAGTCACCCCCCACA CATTC AACCAGAATGATATTTCCCTATTTGCCTACG CCATCCTACGATCTATTCCAAACAAACTGGGAGG AGTTCTCGCACTATTATTCTCCATCTTAGTACTAAT AGTCGTGCCGCTTCTACACACCTCAAACAACGA GGA CTGACATTCCGCCCCGATCACCCAATTCCTATT CTGAACCCTAGTGGCAGACATAATCATCTTAACAT GGATCGGGGGCATAACCAGTAGAGCACCCCTTTAT CATCATTTGGACAAATTGCATCAGCCCTATACTTTG CACTATTCCTTATCCTTATTCCATTAGCAGGATGA TTGGA
--	---

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Акт внедрения результатов исследований и методическая рекомендация

Акт внедрения

ТОО «НПЦРХ» в рамках программы «Научно-технологическое обеспечение комплексного развития аквакультуры Казахстана путем разработки и внедрения инновационных технологий и новых объектов рыбоводства» (ИРН BR10264236)

Кызылординская обл., с. Косжар «25» августа 2023 г.

ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства», в лице Исбекова К.Б., генерального директора, Адырбековой К.Б. и.о.зав.лабораторией генетики гидробионтов и РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник» в лице директора Мырзагазиева С. составили настоящий акт о том, что в рамках бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований» подпрограмма 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий» по специфике 154 «Оплата услуг по исследованиям», в рамках программы «Научно-технологическое обеспечение комплексного развития аквакультуры Казахстана путем разработки и внедрения инновационных технологий и новых объектов рыбоводства», проведено внедрение научно-исследовательских, научно-технических работ и(или) результатов научной и(или) научно-технической деятельности:

1. Наименование внедрения (разработка, способ, рекомендации и тп.):
Разработан генетический масс-паспорт для ремонтно-маточного стада (РМС) аральского усача (*Luciobarbus brachycephalus*)
2. Место и время внедрения: Кызылординская область, Аральский район, с.Косжар, 2023 г., 2023 январь-август
3. Результатом внедрения явилось (краткая аннотация):
Проведен поиск и апробация микросателлитных локусов для генетической паспортизации производителей отобранных для формирования РМС. Локусы были подобраны соответственно таксономическому положению вида.
4. Экономический эффект от внедрения: в перспективе увеличение численности, промысловый возврат вида и повышение рыбопродуктивности водоемов
5. Социальный эффект от внедрения: расширение спектра деятельности рыбопитомника и появление новых рабочих мест.
6. Экологический эффект от внедрения: сохранения биоразнообразия и генетический мониторинг вида.

Подписи сторон:

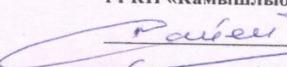
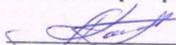
<p>РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник»  Мырзагазиев С. (подпись)  «25» августа 2023 г.</p>	<p>ТОО «Научно-производственный центр рыбного хозяйства»  Исбеков К.Б. (подпись)  М.П. «25» августа 2023 г. и.о.зав.лабораторией генетики гидробионтов  Адырбекова К.Б. (подпись) «25» августа 2023 г.</p>
---	--

Рисунок Д.1 - Акт внедрения результатов исследований в РГКП «Камышлыбашский рыбопитомник»

Қазақстан Республикасының
Экология және табиғи
ресурстар министрлігі
Балық шаруашылығы комитеті

Комитет рыбного хозяйства
Министерства экологии и
природных ресурсов
Республики Казахстан

«БАЛЫҚ ШАРУАШЫЛЫҒЫ ҒЫЛЫМИ-ӨНДІРІСТІК
ОРТАЛЫҒЫ» ЖШС (БШҒӨО ЖШС)
ТОО «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА» (ТОО НПЦРХ)



АРАЛ ҚАЗЫНЫҢ (*LUCIOBARBUS BRACHYCEPHALUS*)
ТАУ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ҮШІН
МИКРОСАТЕЛЛИТТІК ЛОКУСТАРДЫ ТАҢДАУ БОЙЫНША
ҰСЫНЫСТАР



РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ПОДБОРУ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ РМС АРАЛЬСКОГО УСАЧА
(*LUCIOBARBUS BRACHYCEPHALUS*)

ӨОЖ 639.303
КБЖ 47.2
А 75

Ұсыныстар «БШ ҒӨО» ЖШС Ғылыми кеңесімен қаралып
мақұлданды, 2023 жылғы 16 наурыздағы
№ 1 хаттамадан № 3 үзінді

Авторлар:

Исбеков К.Б., «БШ ҒӨО» ЖШС бас директоры б.ғ.д., асс.
профессор (доцент),
Асылбекова С.Ж., «БШ ҒӨО» ЖШС бас директорының орынбасары
б.ғ.д., асс. профессор (доцент),
Адырбекова К.Б., генетика және гидробионттар зертханасының
меңгерушісі м.а.

А 75 Арал қазынының (*Luciobarbus brachycephalus*) ТАУ
генетикалық паспортизация үшін микросателлиттік локустарды
таңдау бойынша ұсыныстар. – Алматы: Everest, 2023. – 21 б.

ISBN 978-601-04-6407-0

Арал қазына микросателлиттік (STR) локустарды
апробациялау әдісі сипатталған. Ұсыныстар балық шаруашылығы,
аквакультура саласындағы мамандарға арналған.

Ұсыныстар "Инновациялық технологиялар мен жаңа балық өсіру
нысандарын өзірлеу және енгізу арқылы Қазақстанда
аквакультураны кешенді дамытуды ғылыми-технологиялық қолдау"
ғылыми техникалық бағдарламасы шеңберінде жарық көрді.

Зерттеуді Қазақстан Республикасының Экология және
табиғи ресурстар министрлігі қаржыландырады (BR № 10264236
гранты).

ӨОЖ 639.303
БКЖ 47.2

ISBN 978-601-04-6407-0

© «БШҒӨО» ЖШС 2023

Мекен жайы: 050016, Алматы қ., Сүйінбай д-лы., 89 «А»,
E-mail: info@fishrhc.kz, тел. 8(7273)83-17-15

Рисунок Д.2 - Методическая рекомендация по подбору микросателлитных локусов для генетической паспортизации РМС аральского усача