

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОЗЁРНОГО И РЕЧНОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА»
(ФГБНУ «ГосНИОРХ»)

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ, ГИБРИДИЗАЦИЯ, ПЛЕМЕННОЕ ДЕЛО И ВОСПРОИЗВОДСТВО РЫБ

Материалы Международной конференции, посвященной памяти
профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова

Санкт-Петербург, 2013

• ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПИЛЕНГАСА (*LIZA NAEMATOSCHILA*), ОБИТАЮЩЕГО В АЗОВСКОМ МОРЕ

А.В. МИРЗОЯН, Е.А. ИВАНОВА, Н.Н. ТИМОШКИНА, Н.А. НЕБЕСИХИНА

ФГУП «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», г. Ростов-на-Дону

Введение

Целенаправленная акклиматизация в Азово-Черноморском бассейне дальневосточной кефали-пиленгаса является одним из немногочисленных примеров успешной интродукции рыб. Этот вид вселяли путем нескольких завозов партий молоди и взрослых особей в течение 1980-х–начала 1990-х гг. (Пряхин, 1996). Новые условия обитания оказались благоприятными для пиленгаса, благодаря чему он образовал самовоспроизводящиеся популяции в акватории Азовского моря и занимает новые ареалы обитания в Черном, Мраморном и Средиземном морях, став одним из важных объектов современного промысла в Азово-Черноморском бассейне.

Важной особенностью биологии азовской популяции пиленгаса является ежегодная массовая миграция части его производителей в весенний период через Керченский пролив в Черное море. Достоверной оценки количества особей, покидающих Азовское море, пока еще нет, но есть мнение, что в Черное море мигрирует большая часть нерестовой популяции, постоянно пополняя черноморское стадо.

Популяционно-генетические исследования интродуцированных видов позволяют выявить динамику генетической изменчивости вселенцев и её роль в процессах адаптации к новой среде. Однако изучение этих процессов имеет не только общебиологическое значение, но важно и для научно обоснованного управления и организации длительной эксплуатации живых природных ресурсов, в частности азовского стада пиленгаса. Цель данной работы заключалась в оценке популяционно-генетических характеристик азово-черноморского пиленгаса с помощью ДНК-фрагментного анализа.

Материал и методы

Материалом исследования служили 100 половозрелых особей пиленгаса, выловленных весной 2007 г. во время нерестовых миграций этого вида в Азовском море и северо-восточной части Чёрного моря. Образцы соматических тканей фиксировали в 96% этаноле. Тотальную ДНК из соматических тканей эстрагировали классическим фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984).

Пробы ДНК использовали для проведения ISSR- и RAPD-анализа.

RAPD-PCR анализ проводили с 11 праймерами произвольной последовательности, из которых были отобраны 4 олигонуклеотида (OPA02, OPE03, OPE04, OPE15), позволившие получить воспроизводимые, полиморфные спектры. Реакционная смесь (25 мкл) для проведения полимеразной цепной реакции содержала 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 0.01% Tween-20, 1,2 мМ MgCl₂, по 150 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 100 пкМ праймера, 10 нг ДНК и 1 единицу Taq-полимеразы («Синтол»). Амплификацию проводили в термоциклере PTC-225 «MJ Research» (США) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК: 95 °С – 10 мин, синтез ПЦР-продуктов (36 циклов): денатурация – 94 °С – 30 с, отжиг праймеров – 36 °С – 30 с, синтез ДНК – 72 °С – 1 мин, достройка цепей: 72 °С – 10 мин.

ISSR-PCR с двумя стандартными праймерами - (GACA)₄ и (GTC)₈ осуществляли по следующей схеме. Реакционная смесь (25 мкл) содержала компоненты и концентрации, указанные выше для RAPD-PCR, кроме концентрации MgCl₂, которая для праймера (GTC)₈ составила 1.76 мМ, для (GACA)₄ - 1.6 мМ. Режим амплификации включал следующие стадии: предварительная денатурация ДНК: 95 °С – 10 мин, синтез ПЦР-продуктов (36 циклов): денатурация – 94 °С – 1 мин, отжиг праймеров – 52 °С – 1 мин, синтез ДНК – 72 °С – 1 мин, достройка цепей: 72 °С – 10 мин.

Продукты амплификации фракционировали в 6% ПААГ в TBE-буфере (Маниатис и др., 1984). По окончании электрофореза спектры визуализировали окраской в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) с дальнейшим фотографированием в проходящем УФ-свете.

Анализ данных ДНК-фингерпринтинга. Данные ДНК-фингерпринтинга представляли в виде общей бинарной матрицы типа «объект-признак». Расчет коэффициентов кросс-корреляции индивидуальных спектров и кластерный анализ осуществляли с помощью программы Phoretix 1D Database («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

Частоты рецессивного аллеля q_j^i RAPD- и ISSR-локусов, их дисперсии $Var(q_j^i)$, несмещенные оценки гетерозиготности H_j^i и среднее значение H_j^i по всем локусам рассчитывали по формулам, предложенным Животовским (Zhivotovsky, 1999).

Результаты и обсуждение

Из 11 исследованных RAPD-праймеров только для OPA02, OPE03, OPE04 и OPE15 были получены четкие RAPD-паттерны. Остальные олигонуклеотиды демонстрировали мономорфность либо инициировали синтез небольшого количества фрагментов, либо

слабых по интенсивности или сливающихся в «шмер» бэндов, что делает бессмысленным их применение для изучения генетического полиморфизма пиленгаса. Подобный скрининг позволил выбрать два ISSR-праймера из шести исследованных.

В целом в двух выборках использованные RAPD-праймеры инициировали синтез 201 ДНК-фрагмента (локуса) с молекулярной массой от 2500 до 60 пн, тогда как ISSR-праймеры генерировали 40 бэндов с молекулярной массой более узкого диапазона 1400-180 пн (табл. 1).

Приведенные данные, полученные с помощью двух методов ДНК-фингерпринтинга, демонстрируют удовлетворительные результаты по такому наиболее важному для популяционно-генетических исследований показателю, как полиморфность. Изменчивость RAPD и ISSR-маркеров, оцененная по доле полиморфных локусов и числу аллелей на локус, была высокой и существенно не различалась при сравнении черноморских и азовских особей. Диагностических маркеров, которые присутствовали бы в спектрах образцов одной выборки и отсутствовали у представителей другой, не обнаружено.

Таблица 1

Характеристика RAPD- и ISSR-фингерпринтов пиленгаса

Праймер	Размер выборки, N	Количество бэндов	Размер бэндов, пн	Диапазон числа бэндов на особь	Среднее число аллелей на особь	Доля полиморфных локусов
RAPD						
OPA02	40	66	2480-50	12-25	19.75 ± 1.93	0.939
OPE03	42	58	3000-50	13-27	19.76 ± 1.94	0.862
OPE15	39	31	2330-100	13-18	16.19 ± 1.23	0.742
OPE04	42	46	1600-80	12-29	20.55 ± 1.68	0.913
ISSR						
(GACA) ₄	50	17	990-300	7-13	10.30 ± 0.14	0.588
(GTC) ₈	50	23	1420-180	6-12	7.99 ± 0.22	0.913

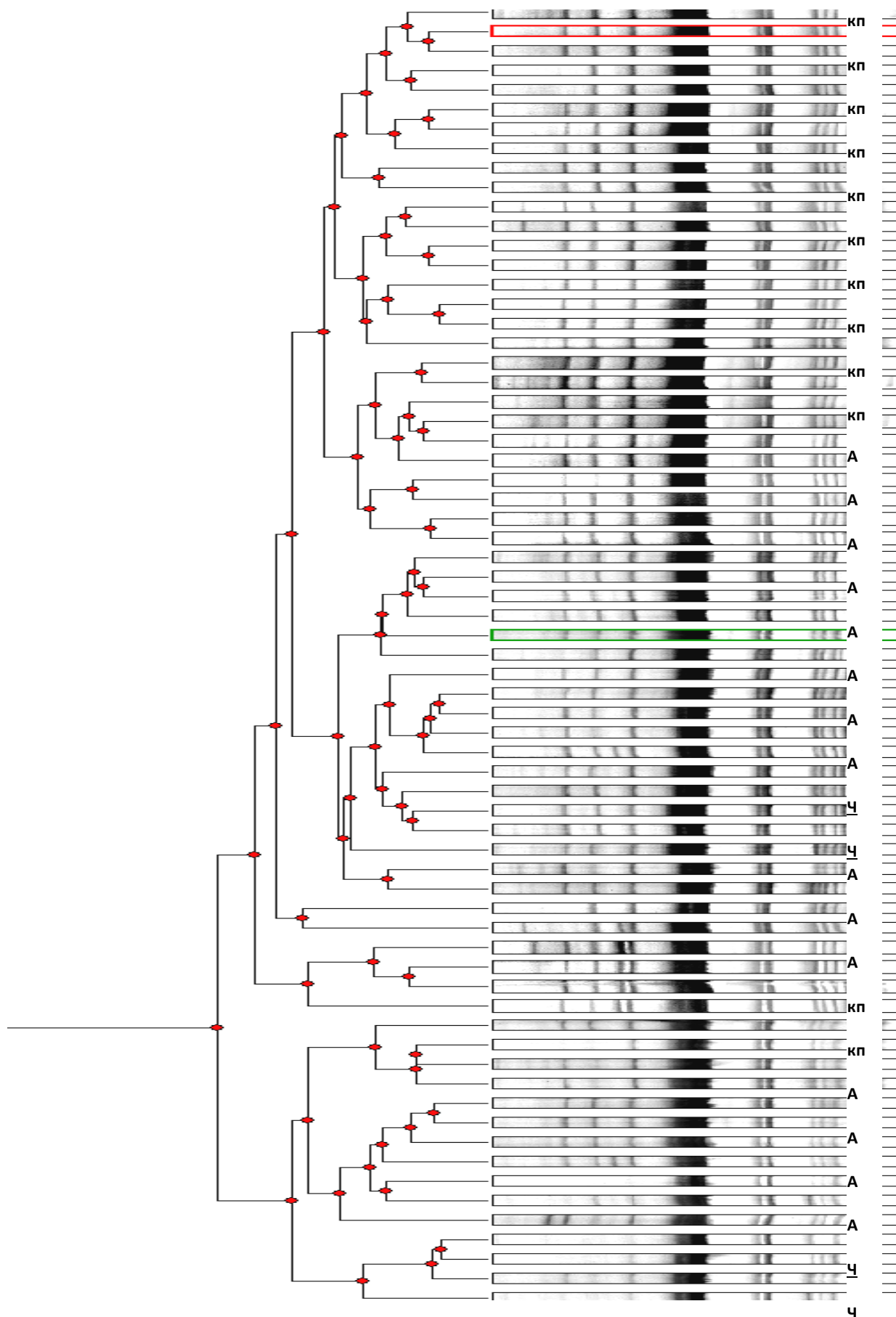
В ходе математической обработки бинарных таблиц, построенных на основе RAPD и ISSR-спектров, были рассчитаны средние значения гетерозиготности по использованным праймерам (табл. 2).

Сравнительная характеристика внутригрупповой гетерозиготности в выборках пиленгаса из Азовского и Черного морей, рассчитанная на основе RAPD– и ISSR-спектров

Метод	Праймер	Размер выборки, N	Азовская выборка	Черноморская выборка
RAPD	OPA02	50	0.213 ± 0.134	0.223 ± 0.114
	OPE03	50	0.231 ± 0.107	0.220 ± 0.127
	OPE15	50	0.267 ± 0.130	0.289 ± 0.151
	OPE04	50	0.306 ± 0.122	0.297 ± 0.112
	Среднее значение		0.254 ± 0.123	0.257 ± 0.126
ISSR	(GACA) ₄	50	0.226 ± 0.104	0.200 ± 0.098
	(GTC) ₈	50	0.220 ± 0.094	0.225 ± 0.108
	Среднее значение		0.223 ± 0.099	0.213 ± 0.103

Средняя гетерозиготность исследованной выборки пиленгаса, выловленного в Азовском море, по RAPD составила $0,254 \pm 0,123$, по ISSR - 0.223 ± 0.099 , выловленного в Черном море - 0.257 ± 0.126 и 0.213 ± 0.103 соответственно. Полученные значения внутригрупповой гетерозиготности в азовской и черноморской выборках пиленгаса достоверно не различаются между собой. Выявленный методами фрагментного ДНК-анализа уровень генетического полиморфизма пиленгаса существенно не отличается от значений, определенных для других видов класса Pisces. Однако мы располагаем литературными данными о сокращении аллельного разнообразия азовской популяции пиленгаса по сравнению с исходной япономорской популяцией на фоне сохранения общего уровня гетерозиготности. Так, по ряду оценок в интродуцированной популяции пиленгаса число аллозимных аллелей на локус уменьшилось на 38%, количество гаплотипов мтДНК – на 30% (Омельченко и др., 2004; Салменкова и др., 2007).

Результаты кластерного анализа исследуемых выборок пиленгаса объединили особей в несколько кластеров различной иерархии. Анализ идентичности полученных кластеров по RAPD показал, что группа пиленгаса из Азовского моря, представляющая собой гетерогенную смесь рыб, имеет высокую степень генетического сходства с черноморской группой. Сходные результаты получены и при анализе ISSR данных с праймером (GTC)₈. Данные ISSR анализа с праймером (GACA)₄ позволили дифференцировать группу «черноморского» пиленгаса, однако отмечаются включения черноморских особей в другие кластеры (см. рисунок).



UPGMA-дендрограмма генетического сходства нерестовых групп пиленгаса на основе ISSR - (GACA)_n:

А – особи из Азовского моря, Ч – особи из Черного моря, кп – особи, выловленные в Керченском проливе

Примечательно, что большинство особей из группы, условно названной «керченский пролив», обнаружили большую генетическую близость с азовской выборкой, что согласуется с данными об однонаправленной миграции пиленгаса в Чёрное море.

Топология дендрограмм, построенных на основании двух методов анализа, имеет различия. Однако нет оснований утверждать, что та или иная дендрограмма более правдиво отражает отношения между стадами азово-черноморского пиленгаса. Отметим, что представленные результаты являются предварительным этапом исследования генетического полиморфизма *Liza haematocheilus* методами ДНК-фрагментного анализа. Возможно, при увеличении размера выборок и количества RAPD- и ISSR-праймеров, отличающихся от вышеуказанных по уровню полиморфизма, общая картина может измениться.

В более ранней работе, исследовавшей аллозимную изменчивость азово-черноморского пиленгаса, было продемонстрировано формирование генетической дифференциации экологических группировок вида, связанной с разной соленостью нерестовых районов (Омельченко и др., 2004). Полученные нами результаты также дают основание сделать вывод об экологической направленности наблюдаемой кластеризации пиленгаса, что может быть связано с действием адаптивного механизма в широком диапазоне солености.

Таким образом, исследованные группы пиленгаса имеют достоверно не отличающийся уровень генетической вариабельности. Данные по ISSR показывают существование местной черноморской группировки, хотя, по всей видимости, области распределения пиленгаса в пространстве существенно перекрываются.

ЛИТЕРАТУРА

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984: 480 с. (Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular Cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.)
- Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Махоткин М.А. и др. Дальневосточный пиленгас *Mugil soiyu* Basilewski (Mugilidae, Mugiliformes): генетическая структура популяций и её изменения при акклиматизации. – Генетика, 2004, т. 40, № 8: 1113-1122.
- Салменкова Е.А., Гордеева Н.В., Омельченко В.Т. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК дальневосточной кефали – пиленгаса *Liza haematocheilus* Temminck & Schligil, акклиматизированной в Азово-Черноморском бассейне. – Генетика, 2007, т. 43, № 9: 1273-1276.