

УДК 597.442-115(262.81)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
РУССКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*)
ИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
ВОЛЖСКО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА**

Надежда Николаевна Базелюк, кандидат философских наук, заведующая лабораторией, Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Российская Федерация, 414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1, bazelyuk@yandex.ru

Наталья Викторовна Козлова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Российская Федерация, 414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1, kaspiy-info@mail.ru

Руфия Мутыгулаевна Мухамедова, младший научный сотрудник, Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Российская Федерация, 414056, г. Астрахань, ул. Савушкина, 1, kaspiy-info@mail.ru

Актуальность молекулярно-генетических исследований и идентификации русских осетров предопределена широким варьированием их фенотипа под воздействием факторов внешней среды. Применение методов молекулярно-генетической идентификации осетровых из естественных популяций Волжско-Каспийского бассейна позволяет идентифицировать их популяционно-видовой уровень и оценить генетическое разнообразие в целях восстановления запасов осетровых и сохранения генофонда ценных видов рыб. Сотрудники лаборатории физиологии и генетики рыб научно-экспериментального комплекса по молекулярно-генетическим исследованиям ФГУП «КаспНИРХ» исследовали внутривидовую изменчивость участка митохондриальной ДНК и участка ядерной ДНК, выделенных из образцов ткани (фрагментов плавников) 87 особей русского осетра, выловленных в р. Волга и в российском секторе Северного Каспия. Для видовой идентификации двух митохондриальных митотипов методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) использовали три видоспецифичных праймера. Для микросателлитного анализа фрагментов ядерной ДНК использовали четыре локуса с флуоресцентными метками. Рассматриваемые в статье методы молекулярно-генетической идентификации осетровых используются генетиками для видовой идентификации не только особей, но и икры и других продуктов их переработки.

Ключевые слова: осетр, митохондриальная ДНК, ядерная ДНК, микросателлитный анализ, митотипы, полиморфизм, полимеразно-цепная реакция, праймеры, амплификация

**THE MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF RUSSIAN STURGEON
(*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) FROM NATURAL POPULATIONS
IN THE VOLGA-CASPIAN BASIN**

Bazelyuk Nadezhda N., Ph.D. (Philosophy), Chief of laboratory, Caspian Fisheries Research Institute, 1 Savushkin St., Astrakhan, 414056, Russian Federation, bazelyuk@yandex.ru

Kozlova Natalya V., Ph.D. (Biology), Research Assistant, Caspian Fisheries Research Institute, 1 Savushkin St., Astrakhan, 414056, Russian Federation, kaspiy-info@mail.ru

Mukhamedova Rufiya M., junior research assistant, Caspian Fisheries Research Institute, 1 Savushkin St., Astrakhan, 414056, Russian Federation, kaspiy-info@mail.ru

The relevance of molecular-genetic studies and identification of Russian sturgeon is predetermined by wide variation of their phenotype caused by environmental factors. The application of the methods of molecular-genetic identification of sturgeons from natural populations of the Volga-Caspian basin will help to identify their population and species level and to assess genetic diversity in order to preserve the nuclear stock of valuable fish species. The scientists from the laboratory of fish physiology and genetics of the scientific and experimental complex for molecular and genetic investigations of FSUE "CaspNIRKh" have analyzed the intraspecies variability of mitochondrial DNA element and nuclear DNA element, extracted from tissue specimens (fragments of fins) of 87 specimens of Russian sturgeon, caught at the Volga river and at the Russian part of the Northern Caspian. Three species-specific primers were used for specific identification of two mitochondrial mitotypes by PCR method. Four locuses with fluorescent marks were used for microsatellite analysis of nuclear DNA fragments. The considered methods of the molecular-genetic identification of sturgeons are reliable for species identification both of specimen and eggs and other processing products.

Keywords: sturgeon, mitochondrial DNA, nuclear DNA, microsatellite analysis, mitotypes, polymorphism, polymerase chain reaction, primers, amplification

На сегодняшний день главными проблемами Каспийского бассейна являются сокращение численности, уменьшение генетического разнообразия, угроза необратимой потери популяций осетровых рыб. В связи с резким снижением численности природных популяций широко распространились технологии выращивания осетровых в искусственных условиях и выпуск молоди в естественную среду обитания, что может привести к потере внутри- и межпопуляционного разнообразия и накоплению генетического груза.

Целью настоящей работы является молекулярно-генетическая идентификация русского осетра из естественных популяций Волжско-Каспийского бассейна.

Межвидовую и внутривидовую изменчивость исследуют, анализируя контрольный регион митохондриальной ДНК (мтДНК) с помощью набора видоспецифических праймеров [1]. Индивидуальные генетические особенности выявляют с помощью микросателлитного анализа фрагментов ядерной ДНК [6].

Анализ мтДНК, проведенный в лаборатории физиологии и генетики рыб в научно-экспериментальном комплексе по молекулярно-генетическим исследованиям ФГУП «КаспНИРХ», выявил в каспийской популяции русского осетра особей с двумя различными митотипами. Один из митотипов характеризуется высокой гомологией с мтДНК сибирского осетра (*A. baerii*). По аналогии с латинским наименованием вида, этот митотип был назван "baerii-like" (BL) [5]. По оценкам различных авторов, в каспийской популяции русских осетров особи с BL митотипом встречаются с частотой от 0,3 до 0,6 [2; 5; 6]. AFLP- и STR-анализы не подтвердили предположение о недавнем появлении этого митотипа вследствие межвидового скрещивания при искусственном воспроизводстве. Исследования единичных нуклеотидных замен Д-петли мтДНК показали близость, но не идентичность митотипа сибирского осетра и митотипа BL русского осетра [3; 5]. Генетические исследования показывают, что кариотипическая эволюция осетровых рыб сопровождалась ограниченным числом изменений в хромосомах. Скорость молекулярной эволюции осетров на уровне белков, последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК низкая [4].

Материалы и методы исследований

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили пробы 87 фрагментов плавников русских осетров, выловленных в Северном Каспии, а также 6 фрагментов плавников русских осетров, выловленных в р. Волга на тоне Балчуг. На анализ мтДНК взято 70 проб русского осетра (36 самок, 34 самца). Ядерная ДНК проанализирована у 28 особей русского осетра (15 самок, 13 самцов). Тканевые пробы плавников рыб отбирали прижизненно, после фиксации в 96%-ом этаноле хранили в холодильнике.

Выделение ДНК из образцов производилось солевым методом в соответствии с ТУ 9398-001-73867468-2005 с использованием набора реагентов Diatom DNA Prep 200.

Реакционная смесь полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для видовой идентификации и ПЦР для микросателлитного анализа (STR) объемом 15 мкл состояла из следующих компонентов: реакционный буфер – 10 мМ («Силекс», Москва); MgCl₂ – 25 мМ («Силекс», Москва); dNTPs – 2,5 мМ («Силекс», Москва); термостабильная полимеразы – 5,0 U («Силекс», Москва); ДНК – 3 мкл; деионизированная вода (milliQ) до полного объема.

Для видовой идентификации митохондриальных митотипов (мтДНК) методом ПЦР использовали видоспецифичные праймеры – 10 Пмоль (Applied Biosistem, USA) (табл. 1), для микросателлитного анализа – четыре локуса An 20, Afug 41, Afug 51, AoxD 165 с флюоресцентными метками – 10 Пмоль (Applied Biosistem, USA) (табл. 2).

Таблица 1

Праймеры для видовой идентификации осетровых рыб

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Видоспецифичность	Длина продукта, п.н.
ANR	TATACACCATTATCTCTATGT	Для всех видов	–
AGF	GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA	Русский осетр GUE	420
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	Русский осетр BL	215

Таблица 2

Локусы для микросателлитного анализа

Локус	Последовательность (5'-3')	Размер аллелей, п.н.
An 20	F: AATAACAATCATTACATGAGGCT R: TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT	129–187
Afug 41	F: TGACGCACAGTAGTATTATTTATG R: TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	173–265
Afug 51	F: ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT R: ATCCCGCTTGCGACTTATTTA	188–278
AoxD165	F: TTTGACAGCTCCTAAGTGATAACC R: AAAGCCCTACAACAATGTCAC	140–208

Аmplификация ДНК, выделенной из образцов, осуществлялась в термоциклере С-1000. ПЦР-идентификацию для двух митотипов мтДНК русских осетров проводили в условиях следующего температурного режима: первоначальная денатурация при 95 °С – 2 мин., 35 циклов, состоящих из четырех ступеней, включая 15 с при 94 °С, 20 с – при 56 °С, 30 с – при 72 °С и 2 мин. – при 72 °С. Реакцию завершала 10-минутная стадия элонгации.

Аmplификацию STR-локусов проводили в два этапа. Первый этап: денатурация при 94 °С (2 мин.), затем диапазон уменьшения температуры отжига праймеров до 58–65 °С (7 циклов), второй этап – денатурация при 90 °С (20 с), диапазон уменьшения температуры отжига праймеров – до 54–65 °С, 40 циклов, повышение температуры до 70 °С – 40 с, снижение температуры до 10 °С – 15 с.

ПЦР-продукты подвергались электрофорезу (в 2 % агарозном геле в 0,5xTBE в присутствии бромистого этидия) для разделения по массе и определения длин фрагментов ДНК осетров путем сравнения с маркером молекулярной массы “100 bp DNA Ladder”.

Для фиксации и обработки ПЦР-продукты подвергались электрофорезу для разделения по массе и определения длин фрагментов ДНК осетров путем сравнения с маркером молекулярной массы “100 bp DNA Ladder”. Для фиксации и обработки результатов использовалась система гель-документации ChemiDoc XRS+. После обработки результатов были установлены длины, т.е. количество пар нуклеотидов (п.н.) фрагментов ДНК.

При проведении микросателлитного анализа, ПЦР-продукты подвергали капиллярному электрофоретическому разделению и анализировали STR – спектры ядер-

ной ДНК на приборе Genetic Analyzer 3500 с использованием компьютерной программы “Gene Mapper”.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате молекулярно-генетической индентификации русских осетров, выловленных в Северном Каспии весной 2012 г., обнаружено 72,7 % особей с митотипом GUE и 27,3 % с BL митотипом. У русских осетров, выловленных летом, соотношение митотипов GUE и BL составило 54,2 и 45,8 % соответственно. В осенний период отмечено снижение количества русских осетров с митотипом BL до 16,7 % и увеличения количества особей с митотипом GUE до 83,3 %. Анализ идентификации мтДНК русских осетров (6 самцов массой 5,0–10,0 кг, 1 самка массой 33,0 кг), выловленных в р. Волга, выявил у 35,7 % рыб митотип GUE, у 62,3 % – BL (табл. 3).

Таблица 3

Митотипы митохондриальной ДНК русского осетра (%)

Место вылова	Период исследований	Митотип мтДНК	
		GUE	“Baerii-like”
Северный Каспий	Весна	72,7	27,3
	Лето	54,2	45,8
	Осень	83,3	16,7
р. Волга, тоня Балчуг	Лето	38,4	61,6

Анализ STR-спектров ядерной ДНК русских осетров, выловленных в Северном Каспии, показал полиморфизм генов и доминирование аллелей в четырех исследованных локусах. Летом было выявлено 40 различных аллелей у 9 особей, осенью – 43 различных аллеля у 14 особей. Число аллелей на локус варьировало от 6 (An 20) до 15 (A₁ug 41). В локусе An 20 доминировала аллель, состоящая из 165 пар нуклеотидов (п.н.), в A₁ug 41 – 197, 221 и 237 п.н., A₁ug 51 – 232 п.н., AoxD 165 – 178 п.н. Результаты микросателлитного анализа, выявляющие характерные индивидуальные наборы аллелей в локусах и полиморфизм, являются основой для составления генетического паспорта рыб, оценки уровня генетического разнообразия, контроля инбридинга при искусственном оплодотворении.

Таким образом, используемый метод видовой ПЦР-идентификации мтДНК осетровых рыб позволяет выделять носителей митотипов GUE и BL у русского осетра, что является диагностическим маркером для каспийской популяции русского осетра. Результаты анализа геномной ДНК по STR-маркерам подтвердили высокий полиморфизм русского осетра из естественных популяций и возможность определения индивидуальных генетических особенностей рыб.

Список литературы

1. *Мюге Н. С.* Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н. С. Мюге, А. Е. Барминцева, С. М. Расторгуев, В. Н. Мюге, В. А. Барминцев // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 7. – С. 913–919.
2. *Расторгуев С. М.* Определение полной нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК Понто-Каспийской группы осетров / С. М. Расторгуев, А. А. Волков, В. А. Барминцев // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития : Материалы докладов IV Междун.научно-практ.конф. (г. Астрахань, 13–15 марта 2006 г.). – Москва : ВНИРО, 2006. – С. 44–47.
3. *Тимошкина Н. Н.* Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (Acipenseriformes) / Н. Н. Тимошкина, Д. И. Водолажский, А. В. Усатов // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 12–24.
4. *Birstein V. J.* Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications / V. J. Birstein, P. Doukakis, R. DeSalle // Cons. Gen. – 2000. – Vol. 1. – P. 81–88.

5. **Mugue N.** Sturgeon mtDNA control region polymorphism and its suitability for species identification / N. Mugue, A. Barmintseva, S. Rastorguev et al. // Identification of Acipenseriformes Species in Trade : 2nd Workshop. (29 Sept. – 1 Oct. 2006). – Berlin, 2006. – P. 9–10.

6. **Zane L.** Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (Acipenser naccarii) / L. Zane, T. Patarnello, A. Ludwig et al. // Mol. Ecol. Notes. – 2002. – Vol. 2. – P. 586–588.

References

1. Mugue N. S., Barmintseva A. E., Rastorguev S. M., Mugue V. N., Barmintsev V. A. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification. *Russian Journal of Genetics*, 2008, vol. 44, no. 7, pp. 793–798.

2. Rastorguev S. M., Volkov A. A., Barmintsev V. A. Opredelenie polnoy nukleotidnoy posledovatelnosti mitokhondrialnoy DNK Ponto-Kaspiyskoy gruppy osetrov [Opredelenie complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Ponto-Caspian sturgeon]. *Akvakultura osetrovyykh ryb: dostizheniya i perspektivy razvitiya: Materialy dokladov IV Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii (g. Astrakhan, 13–15 marta 2006 g.)* [Sturgeon aquaculture: achievements and prospects: Proceedings of the IV International Scientific Conference (Astrakhan, 13–15 March 2006)]. Moscow, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography Publ., 2006, pp. 44–47.

3. Timoshkina N. N., Vodolazhskiy D. I., Usatov A. V. Molekulyarno-geneticheskie markery v issledovanii vnutri- i mezhdovidovogo polimorfizma osetrovyykh ryb (Acipenseriformes) [Molecular genetic markers in the study of intra- and interspecific polymorphisms of sturgeons (Acipenseriformes)]. *Ekologicheskaya genetika* [Russian Journal of Genetics: Applied Research], 2010, vol. 8, no. 1, pp. 12–24.

4. Birstein V. J., Doukakis P., DeSalle R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications. *Cons. Gen.*, 2000, vol. 1, pp. 81–88.

5. Mugue N., Barmintseva A., Rastorguev S. et al. Sturgeon mtDNA control region polymorphism and its suitability for species identification. *Identification of Acipenseriformes Species in Trade: 2nd Workshop (29 Sept. – 1 Oct. 2006)*. Berlin, 2006, pp. 9–10.

6. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Mol. Ecol. Notes*, 2002, vol. 2, pp. 586–588.

УДК 575.8533167:576.316.7:581

КАРИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОФАНТА АНИСОВОГО (*LOPHANTHUS ANISATUS BENTH.*)

Маргарита Федоровна Козак, доктор биологических наук, профессор, Астраханский государственный университет, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1, mkozak@yandex.ru

Раушан Темиржановна Турдугулова, аспирант, Астраханский государственный университет, Российская Федерация, 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1, mkozak@yandex.ru

Лофант анисовый (*Lophanthus anisatus Benth.*) – многолетнее травянистое эфиромасличное растение семейства Lamiaceae. Цель работы: анализ кариотипа, морфометрических параметров хромосом, их идентификация, составление идиограммы хромосом. Изучение кариотипа проводилось в клетках апикальной меристемы корешков на метафазных пластинках, на временных препаратах с использованием предобработки колхицином для укорочения хромосом и выявления центромерной зоны. Окрашивание корешков проводили ацетокармином. Изучена структура кариотипа лофанта анисового, интродуцированного в Астраханской области. Представлены результаты морфометрического анализа хромосом. Хромосомный набор ($2n=18$) содержит 7 пар (I, II, IV–VII, IX) субметацентрических и 2 пары (III, VIII) метацентрических хромосом. Данный вид относится к группе видов семейства Lamiaceae, имеющих в диплоидном наборе 18 хромосом. Средняя суммарная абсолютная длина хромосомного набора равна $41,60 \pm 1,85$ мкм (C.V.=14,2 %). Коэффициенты вариации хромосомных показателей соответствуют среднему и высокому