

Физиологические и генетические исследования стерляди (*Acipenser ruthenus*) в современных экологических условиях

Канд. бiol. наук Н.Н. Базелюк, Канд. бiol. наук Н.В. Козлова, канд. бiol. наук Е.Г. Макарова, А.В. Дубовская, Е.В. Шемякина, С.А. Головинова, Д.Р. Файзулина, Н.В. Карыгина, О.В. Попова – Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГУП «КаспНИРХ»), г. Астрахань, kaspiy-info@mail.ru

Ключевые слова: биохимические и гистологические исследования, микросателлитный анализ ДНК, гетерозиготность, генетическое разнообразие, загрязняющие вещества

В работе показаны результаты биохимических, гистологических и генетических исследований тканей стерляди, выловленной в р. Волга на тоневом участке «Балчуг» в Астраханской области, а также токсикологических исследований водной среды. Материалом для анализа служили данные, полученные при мониторинговых исследованиях неполовозрелых особей и проб волжской воды по содержанию основных токсикантов. Выявленные изменения среды обитания отразились на физиологическом и генетическом состоянии исследованной стерляди.

Введение

Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) является одним из представителей пресноводных осетровых и отличается от других рыб семейства наиболее ранним наступлением половой зрелости и небольшими размерами. Стерлядь встречается в бассейнах почти всех рек Европейской части России и Сибири. Первое место по изобилию стерляди занимает р. Волга со всеми главными и второстепенными притоками.

Цель работы – оценить физиологическое и генетическое состояние стерляди, выловленной в Астраханской области на тоневом участке р. Волга «Балчуг», в современных экологических условиях.

Материалы и методы исследований

Материал для биохимических, гистологических, генетических и токсикологических исследований собирали летом 2010–2013 гг. в р. Волга на тоневом участке «Балчуг», расположенным выше г. Астрахани и выше по течению реки у с. Замыяны Астраханской области. За время исследований проанализировано 100 экз. неполовозрелых особей стерляди I и II стадий зрелости гонад (С3Г) и 25 проб воды.

На биохимический анализ отбирали пробы крови, гистологический – гонады, генетический – фрагменты плавников стерляди, токсикологический – пробы волжской воды.

Биохимические методы исследования: отбор проб крови у рыб проводили в полевых условиях, отсекая хвостовой

стебель *in vivo*. Цельная кровь отбиралась (0,02–0,5 куб. см) в пробирку, смоченную раствором гепарина (разведение 1:50). Кровь на сыворотку отбиралась в сухую пробирку в количестве 4 куб. см [15].

Содержание гемоглобина определяли в полевых условиях при помощи фотоэлектроколориметра [5]. Исследования показателей сыворотки крови проводили в лаборатории на биохимическом анализаторе *Biochem analyse*, используя стандартные наборы реагентов *High Technology, inc.* При помощи программного обеспечения *Auto Analyzer* версии 6.02.90 определили содержание общего сывороточного белка, б-липопротеидов, общих липидов и холестерина в сыворотке крови.

Функциональную зрелость и структурные изменения гонад изучали согласно классическим методам гистологии [13; 16].

Интерпретацию данных биохимического и гистологического анализа осуществляли с учетом существующих представлений о норме и патологии, полученных в ходе многолетних исследований в лаборатории физиологии и генетики рыб ФГУП «КаспНИРХ».

Генетические методы исследований: выделение ДНК солевой экстракцией [18], полимеразно-цепная реакция (ПЦР), видовая идентификация митохондриальной ДНК (мтДНК) с набором видоспецифичных праймеров [7], микросателлитный анализ (STR) пяти локусов ядерной ДНК [20] (табл. 1).

Таблица 1. Микросателлитные локусы

Локус	Последовательность (5'-3')	Размер аллелей, п.н.
An20	F:ATAACAATCATTACATGAGGCT R:TGGTCAGTTGTTTATTGAT	129-197
Afug41	F:TGACGGCACAGTAGTATTATTTATG R:TGATGTTGCTGAGGCTTTTC	173-285
Afug51	F:ATAATAATGAGCGTGCTTCTGT R:ATTCCGCTTGCGACTTATTTA	208-312
AoxD165	F:TTTGACAGCTCTAAAGTGATACC R:AAAGCCCTAACACAAATGTCAC	140-254
AoxD161	F:CATTCACTGAGACAGACACTC R:ATCTCAGGGACTGCTGTGATTGG	284-332

Гетерозиготность группы (наблюдаемую и ожидаемую) определяли по частотам аллелей пяти исследуемых локусов.

Изменение или сохранение генетического разнообразия диплоидов определяли по индексу Гарза-Вильямсона, используя программу *Arlequin 3.1* [19].

Для токсикологических исследований использовали стандартные методики определения загрязняющих веществ [4; 9; 10; 12].

Результаты и обсуждение

Биохимические исследования. Последние 4 года среднее содержание общего сывороточного белка (ОСБ), холестерина (ХС), В-липопротеинов (β -лп) и общих липидов (ОЛ) в сыворотке крови у стерляди в среднем соответствовало периоду летнего нагула, что свидетельствовало о качественном и количественном достатке кормовой базы р. Волга.

В июне-июле 2013 г. на анализ была отобрана неполовозрелая стерлядь I, I – II и II СЗГ средней массы и длины 689 г и 52 см. В проводимых исследованиях использовались пробы тканей рыб спокойного физиологического состояния, когда на физиологический статус не оказывают влияние гормональные перестройки, связанные с миграцией рыб на нерест.

Среднее содержание гемоглобина в крови у исследованных рыб составило 56,05 г/л, что в 1,1–1,2 раза ниже, чем в исследованиях 2010–2012 годов. Количество гемоглобина в крови рыб может варьировать в широких пределах (от 40 до 147 г/л) и зависит от функционального состояния рыб, этапа репродуктивного процесса и экологических особенностей среды обитания [14] (табл. 2). Общие липиды в сыворотке крови были на высоком уровне, составив в среднем 6,90 г/л, что отражает повышенный метаболизм и хорошую обеспеченность рыб кормом для резервирования ОЛ в мышцах на период зимовки. Содержание В-липопротеинов (транспортной формы липидов) в среднем составило 5,33 г/л, что в 1,5 раза выше данных 2012 г. и свидетельствовало о повышенных возможностях переноса липидов и распределении его между тканями. Повышенный уровень В-липопротеинов предопределял усиленный синтез холестерина, транспорт которого также осуществляется В-липопротеидами. Холестерин крови у исследованных особей был в 2 раза выше, чем в 2011 г., и в 1,2 раза ниже, чем в 2012 г., составив в среднем 1,47 г/л.

Таким образом, средние биохимические показатели крови у исследованной в 2013 г. стерляди находились в пределах нормы, отличаясь при этом повышенным содержанием белков и липидов в сыворотке крови и пониженным уровнем гемоглобина от выборок 2010–2012 годов.

Для полной оценки физиологического состояния выборки стерляди провели гистологические исследования гонад.

Гистологические исследования. В выборке 2013 г. уровень развития яичников 17 самок соответствовал I (23,5%) и II (76,5%) СЗГ. Половые железы 10 самцов находились на I (10%), I-II (10%) и II (80%) СЗГ.

Гистологический анализ выявил нарушения морфогенеза ооцитов протоплasmатического роста у 41% самок II СЗГ. У большинства из них этот процесс носил массовый (свыше 50% ооцитов на срезе) характер. В среднем доля дегенерирующих ооцитов составила 44%.

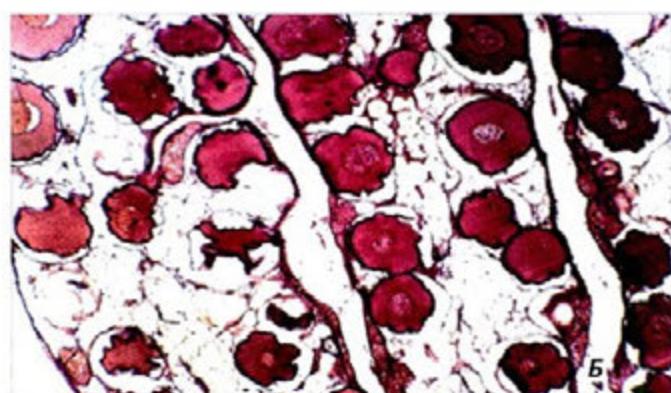
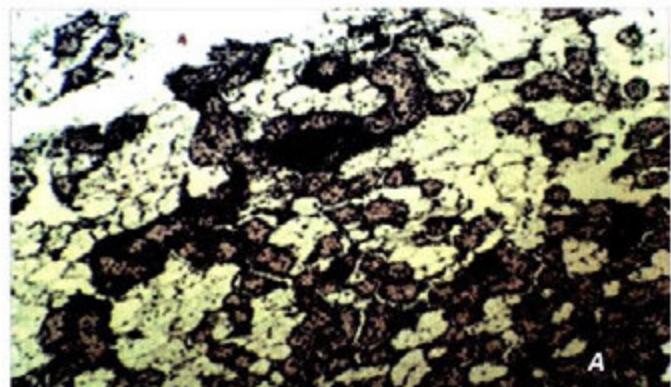


Рис. 1. Нарушения гаметогенеза стерляди II СЗГ
А) Дегенерация ооцитов в яичнике
Б) Участки жирового перерождения в семеннике
Окраска кислым фуксином с докраской по Маллори (увеличение 22x10)

В яичниках самок отмечали деформацию ооцитов протоплазматического роста, изменение ядер: сжатие, вакуолизацию кариоплазмы, гипертрофию ядрышек, появление гипермированных яичников (рис. 1).

В генеративной ткани семенников иногда отмечали утолщение стенок семенных канальцев, у 20% самцов имелись участки жирового перерождения. Сокращение объема генеративной ткани половых желез и замена ее на жировую и соединительнотканную ведет к стерилизации особей [3].

Таким образом, по результатам гистологического анализа отмечены нарушения гаметогенеза у самок и замена генеративной ткани на жировую у самцов стерляди II СЗГ.

Генетические исследования. Микросателлитный анализ пяти локусов ядерной ДНК стерляди выявил 41 аллель и показал колебание числа аллелей на локус от 5 (An20) до 13 (Afug41) (рис. 2). Наибольший полиморфизм проявил локус Afug41 с размерными диапазонами аллелей 201–265 п.н. Наименее полиморфным в выборке оказался локус An20 с размерным диапазоном от 161 до 177 п.н.

Результаты исследования геномной ДНК у стерляди выявили преобладание в локусах An20 аллеля 177 п.н. (77%), в Afug51 – аллеля 252 п.н. (71%), в Afug41 – аллеля 249 п.н. (22%), в AoxD165 аллеля – 188 п.н (27%), в AoxD161 – аллеля

Таблица 2. Физиологово-биохимические показатели крови стерляди, выловленной в р. Волга на тоне «Балчуг» летом 2010–2013 гг.

Годы	Кол-во особей, экз.	Гемоглобин, г/л	ОСБ, г/л	В-лп, г/л	ХС, г/л	ОЛ, г/л
2010	29	60,20±3,2	27,71±2,14	3,56±0,33	1,56±0,34	5,82±0,68
2011	25	60,60±6,1	34,96±2,00	3,32±0,27	0,74±0,05	5,01±0,57
2012	17	68,75±4,39	39,93±2,28	3,47±0,41	1,81±0,17	7,44±1,06
2013	29	56,05±3,16	43,61±3,20	5,33±0,53	1,47±0,12	6,90±0,71

Таблица 4. Показатели генетического разнообразия стерляди, выловленной в 2013 г.

Локус	N	L	H _e	H _a
An20	28	5	0,913	0,898
Afug 41	23	13	0,464	0,400
Afug51	28	6	0,393	0,471
AoxD165	25	8	0,875	0,824
AoxD161	29	11	0,571	0,677

Примечание: N – количество исследованных особей, L – количество идентифицированных в выборке аллелей, H_e и H_a – наблюданная и ожидаемая гетерозиготность

288 п.н. (53%), что подтвердило принадлежность особей к виду *Acipenser ruthenus* и исключило из выборки особей гибридного происхождение с триплоидным набором хромосом [1].

При анализе генетического разнообразия стерляди, выловленной на тоневом участке «Балчуг», значения наблюданной гетерозиготности (H_e) были близки к ожидаемым (H_a) (табл. 4). Показатель наблюданной гетерозиготности (H_e) варьировал от 0,393 до 0,913.

В выборке 2013 г. отмечено отрицательное значение разницы между наблюданной и ожидаемой гетерозиготностью в двух локусах Afug51 и AoxD161 (H_e < H_a), характеризующее дефицит гетерозигот, который мог возникнуть в результате низкой численности производителей и близкородственного скрещивания [11]. Инбридинг оказывает разрушительное воздействие на выживание и репродукцию, влияет на скорость роста и размер взрослых особей. Для каждого вида имеется своя минимальная численность популяции, при которой популяция способна справиться с эффектами инбридинга за счет снижения выживаемости и скорости размножения [17]. В остальных трех локусах была отмечена незначительная положительная разница между наблюданной и ожидаемой гетерозиготностью.

Индекс Гарза-Вильямсона был сходным в исследованных группах стерляди 2012-2013 гг. (от 0,24 до 0,26) и далеким как от 0,0, так и от 1,0, что свидетельствовало о низком генетическом разнообразии стерляди, выловленной в р. Волга на т. «Балчуг» (табл. 5).

Таким образом, молекулярно-генетический анализ показал низкое генетическое разнообразие и дефицит гетерозигот по двум локусам в выборках стерляди 2012-2013 гг.

Токсикологические исследования. Результаты исследований водной среды в районе тоневого участка «Балчуг» р. Волга и выше по течению реки (у с. Замьяны), по содержанию волжской воде загрязняющих веществ, показали превышение ПДК_{р/к} [8]. В районе с. Замьяны исследования проводили в 2011-2013 гг., в районе тоневого участка – в 2012-2013 годах.

В межгодовом аспекте концентрации большинства токсикантов – экстрагируемых нефтяных углеводородов (ЭНУ), хлорорганических пестицидов (ХОП), ртути (Hg), цинка (Zn) и меди (Cu) – отличались значительной вариабельностью значений, характеризуя непостоянство степени и продолжительности токсикологического воздействия на гидробионтов. Максимальной величины, превышающей норматив и среднемноголетний уровень за трехлетний период исследований, в районе с. Замьяны достигали концентрации пестицидов (сумма ХОП) и ртути в 2011 г., растворенных форм меди и цинка – в 2012 г., нефтяных углеводородов – в 2013 г. (рис. 3).

В районе тони «Балчуг», расположенной ниже с. Замьяны, отмечено хронологически-синхронное изменение содержания органических загрязнителей (нефтепродуктов, пестицидов), что может свидетельствовать о поступлении этих токсикантов из вышележащих участков р. Волга (рис. 3). Иная картина наблюдалась в пространственном распределении концентраций ртути и цинка, которые к тоне, как правило, возрастают (по абсолютной величине) и в межгодовой дина-

мике не совпадают с изменениями у с. Замьяны. Поступление этих металлов может быть обусловлено их активным трансграничным атмосферным переносом или наличием в составе сточных вод предприятий и населенных пунктов, расположенных между исследуемыми створами реки.

Таким образом, токсикологическая обстановка в волжских водах изучаемого района достаточно напряженная, т.к. характеризовалась высоким содержанием токсикантов различного генезиса и степени воздействия, которые могут оказывать негативное влияние на условия обитания гидробионтов, в т.ч. стерляди.

Нефтяное загрязнение в повышенных концентрациях в естественной среде воспринимается осетровыми как стресс-фактор. При сочетании с другими токсикантами приводит к усилению воздействия их на рыб. Наибольшее влияние оказывает сочетание нефтяных углеводородов с хлорорганическими пестицидами [2]. Повышенное содержание в водной среде меди и цинка ведет к нарушению воспроизводительной способности и роста рыб [6].

Заключение

Выборка стерляди I и II СЗГ, выловленной в р. Волга на тоневом участке «Балчуг» в 2013 г., по физиологическому состоянию неоднородна и характеризовалась различной степенью функциональных отклонений. В ходе гистологических исследований гонад были установлены разнообразные нарушения в яичниках и семенниках на фоне относительно благополучных показателей крови. Нарушения в созревании гонад, которые ведут к снижению репродуктивного потенциала особей, и метаболические изменения могли быть обусловлены хронической интоксикацией.

В результате молекулярно-генетического анализа выявлен дефицит гетерозигот по двум локусам и низкое генетическое разнообразие исследованной стерляди, что может отразиться на экологической пластичности особей.

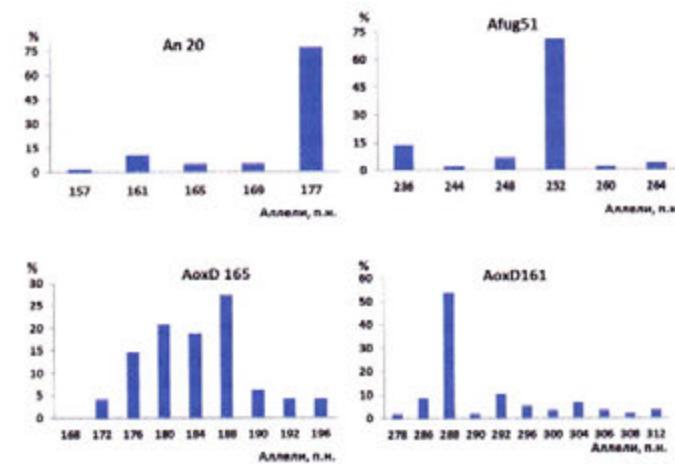
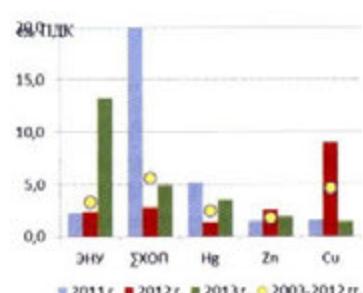


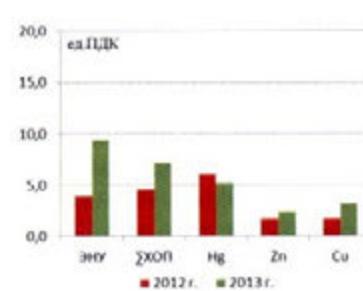
Рис. 2. Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в ядерной ДНК у стерляди, выловленной в 2013 г. в р. Волга на т. «Балчуг»

Таблица 5. Индекс Гарза-Вилиамсона у стерляди, выловленной на тоне «Балчуг»

Год	Кол-во особей, экз.	Кол-во аллелей в 5 локусах	Индекс Гарза-Вилиамсона ±tm	H ₀	H ₁
2012	17	39	0,24±0,05	0,69	0,66
2013	29	41	0,26±0,05	0,65	0,66



A



B

Рис. 3. Динамика содержания токсикантов в волжской воде А) в районе с. Замъяны, Б) на тоневом участке «Балчуг»

Отмеченные физиологические и генетические изменения у исследованной стерляди развивались на фоне неблагополучной токсикологической обстановки волжских вод, способной негативно воздействовать на рост, развитие, численность и адаптацию рыб к современным экологическим условиям среды обитания.

ЛИТЕРАТУРА:

- Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (Acipenseridae) и выявление особей гибридного происхождения // Генетика. 2013. Т.49 (9). С. 1093–1105.
- Гераскин П.П., Металлов Г.Ф., Аксенов В.П., Галактионова М.Л. Нефтяное загрязнение Каспийского моря как один из факторов негативного влияния на физиологическое состояние осетровых рыб // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: мат. I междунар. научно-практич. конф. Астрахань, 2005. С. 54-60.
- Гераскин П.П. Влияние загрязнения Каспийского моря на физиологическое состояние осетровых рыб // Известия Самарского научного центра РАН. Т. 8. № 1. 2006. С. 273-282.
- ГОСТ Р 51212-98 Качество воды. Методы определения содержания общей ртути беспламенной атомно-абсорбционной спектрометрией. М., 1999. – 15 с.
- Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. 325 с.
- Лепилина И.Н., Романов А.А., Калмыков В.А. Гистоморфологические и гематологические показатели у волжской стерляди // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений: мат. I междунар. научно-практич. конф. Астрахань, 2005. С. 129-133.
- Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Растворгев С.М. и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т.44. С. 1-7.
- Нормативы качества воды и водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативы предельно допустимых концентраций вредных веществ водах водных объектов рыбохозяйственного значения. М.: ВНИРО, 2011. 257 с.
- ПНД Ф 14.1:2-4.128-98 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02». М., 1998. 18 с.
- ПНД Ф 14.1:2.22-95. Методика выполнения измерений массовой концентрации ионов железа, кадмия, свинца, цинка и хрома в пробах природных и сточных вод методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии. М., 1995. 21 с.
- Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых Северной Евразии: автореф. дис. д.б.н. 2007. 47 с.
- РД 552.24.412-95. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой концентрации гексахлорбензола, альфа-, бета- и гамма-ГХЦГ, дикофола, дигидрогептахлора, 4,4-ДДТ, 4,4-ДДЕ, 4,4-ДДД, трифлуорина в водах газохроматографическим методом. Ростов-на Дону, 1995. 38 с.
- Романов А.А., Беляева Е.С. Мониторинг гистоморфологических нарушений гонадо-гаметогенеза осетровых рыб Волго-Каспийского региона // Экология молоди и проблемы воспроизводства Каспийских рыб: Сб. науч. Тр. КаспНИРХ. М., 2001. С. 246-268.
- Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. М.: Изд-во Московского университета, Т. 1., 1962. 443 с.
- Судаков Г.А., Власенко А.Д., Ходоревская Р.П. и др. Инструкции по сбору и первичной обработке материалов водных биоресурсов
- Трусов В.З. Созревание половых желез Волго-Каспийского осетра в морской период жизни // Труды ЦНИОРХ, Т. 4. 1972. С. 95-122.
- Франклайн Я.Р. Эволюционные изменения в небольших популяциях // Биология охраны природы: пер. с англ.; под ред. М. Сулея, Б. Уилкокса. Перевод Остроумова С.А.; под ред. и с предисл. А.В. Яблокова. М.: Мир, 1983. С. 160-176.
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25 (20). P. 4692-4693.
- Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // Mol Ecol. 2001. V.10. P.305-318.
- Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (Acipenser naccarii) // Mol. Ecol. Notes. 2002. V.2. P. 586-588.

Physiological and genetic researches of sterlet (*Acipenser ruthenus*) under the modern ecological conditions

Bazelyuk N.N., PhD, Kozlova N.V., PhD, Makarova E.G., PhD, Dubovskaya A.V., Shemyakina E.V., Golovinova S.A., Faizulina D.R., Karygina N.V., Popova O.V. – Caspian Research Institute of Fisheries, kaspiv-info@mail.ru

In the article, the results of biochemical, histological and genetic researches of tissues of sterlet caught in the River Volga in "Balchug" fished area (Astrakhan region) are shown; in addition, the results of toxicological researches of aquatic environment are given. The analysis is based on immature specimen monitoring researches as well as on toxicological probes of Volga water. The revealed environmental conditions have had an effect on physiological and genetic state of sterlet.

Key words: biochemical and histological researches, microsatellite analysis of DNA, heterozygosity, genetic diversity, polluting matters