

Генетическое разнообразие русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) в Каспийском море

Канд. биол. наук **Н.В. Козлова**, канд. биол. наук **Е.Г. Макарова**,
канд. философ. наук **Н.Н. Базелюк** – Каспийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства (ФГБНУ «КаспНИРХ»), Астрахань

@ kaspiy-info@mail.ru

Ключевые слова: русский осетр, микросателлитные локусы, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, полиморфизм



Представлены результаты исследования генетического разнообразия русского осетра в Северном и Среднем Каспии по ядерным (микросателлитные локусы An20, Afug41, Afug51, AoxD165, AoxD161-1) и митохондриальным маркерам (ПЦР-идентификация митотипов). В обеих исследованных выборках выявлены высокие уровни полиморфизма и отсутствие дефицита гетерозигот. Митотип «BL» отмечен у менее 30% особей.

| Введение |

Русский осетр является одним из наиболее важных компонентов биоресурсов Каспийского моря, относится к проходным видам семейства Осетровые (*Acipenseridae*). В течение последних десятилетий численность этого ценного вида рыб значительно сократилась [1; 2].

Создавшаяся катастрофическая ситуация с запасами русского осетра ставит перед рыбохозяйственной наукой на Каспии задачи по сохранению его генофонда в искусственных условиях, путем создания коллекционных стад, охране и восстановлению естественного нереста этого вида [3]. Разработка грамотной стратегии управления рыбными биоресурсами должна основываться на достоверной научной информации, в частности – на генетическом разнообразии и генетической структуре сохраняемого вида [4].

В литературе приведены данные по исследованию полиморфизма осетровых рыб с помощью современных молекулярно-генетических методов [5-10]. Однако подробного анализа генетического разнообразия русского осетра в пределах российского сектора Каспийского моря не проводилось.

Цель настоящей работы – изучить генетическое разнообразие русского осетра в Каспийском море.

| Материал и методы |

Материалом послужили пробы фрагментов спинных и грудных плавников 566 экз. русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), отловленного за период 2012-2015 гг. в северной (483 экз.) и средней (83 экз.) частях Каспийского моря.

Пробы плавников рыб отбирали прижизненно, фиксировали в 96%-ом этаноле на научно-исследовательских судах ФГБНУ «КаспНИРХ» с последую-

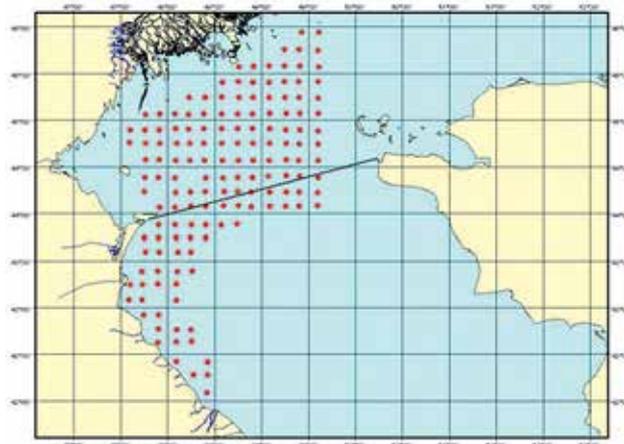


Рисунок 1. Сетка станций отбора проб в Каспийском море

ющей перезаливкой в лаборатории физиологии и генетики рыб в научно-экспериментальном комплексе по молекулярно-генетическим исследованиям. Сетка станций отбора проб с обозначением условной границы Северного и Среднего Каспия представлена на *рис. 1*.

Тотальную ДНК выделяли из фиксированных фрагментов плавников солевым методом с протеиназой K [11], качество выделенной ДНК определяли на спектрофотометре SmertSpecPlus (Biorad, USA). Препараты ДНК использовали для видовой идентификации митотипов митохондриальной ДНК (мтДНК) («baerii-like» - «BL» и типичный русский – «GUE») и микросателлитного анализа (STR).

Аmplification ДНК, выделенной из образцов, осуществлялась в термоциклерах Thermo Cycler C-1000, S-1000 (Biorad, USA). Реакционная смесь полимеразно-цепной реакции (ПЦР) объемом 15 мкл состояла из следующих компонентов: реакцион-

Таблица 1. Локусы для микросателлитного анализа русского осетра

Локус	Последовательность (5'-3')	Размерный диапазон длин, п.н.	Флуоресцентная метка
An20	F:AATAACAATCATTACATGAGGCT R:TGGTCAGTTGTTTTTTATTGAT	141-189	VIC
Afug41	F:TGACGCACAGTAGTATTATTATG R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	173-265	FAM
Afug51	F:ATAATAATGAGCGTCTTCTGTT R:ATCCGCTTGCAGCTATTTA	208-288	VIC
AoxD165	F:TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC R:AAAGCCCTACAACAAATGTACAC	152-204	PET
AoxD161-1	F:CATTCAAGTATGAGACAGACACTC R:ATCTCAGGGACTGCTGTGATTGG	276-336	FAM

ный буфер – 10 мМ (Силекс, Москва); MgCl₂ – 25 мМ (Силекс, Москва); dNTPs – 2,5 мМ (Силекс, Москва); термостабильная полимеразы – 5,0 U (Силекс, Москва); ДНК – 2-3 мкл; праймеры – 10 Пмоль (Applied Biosistem, USA); деионизированная вода (milliQ, Germany) – до полного объема.

Для определения и подтверждения видовой принадлежности особей по митотипам «BL» и «GUE» использовали праймеры ANR (TATACACCATTATCTCTATGT), AGF (GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA), ABF (CAGATGCCAGTAACAGGCTGA) [12].

ПЦР для идентификации митотипов мтДНК русского осетра проводили в условиях следующего температурного режима: первоначальная денатурация при 95°C – 2 мин, 35 циклов, состоящих из четырех ступеней, включая 15 с при 94°C, 20 с – при 56°C, 30 с – при 72°C и 2 мин – при 72°C. Реакцию завершала 10 минутная стадия элонгации. ПЦР-продукты подвергались электрофорезу в горизонтальных камерах SE-1, SE-2 (Хеликон, Москва) (2,0% агарозный гель, 0,5xTBE, бромистый этидий) для разделения по массе и определения длин фрагментов ДНК осетровых рыб, путем сравнения с маркером молекулярной массы 100 bp DNA

Ladder (Хеликон, Москва). Для фиксации и обработки результатов процесса использовалась система гель-документирования ChemiDoc XRS+ (Biorad, USA). После анализа результатов, с помощью программного обеспечения «Image Lab», устанавливали размеры фрагментов мтДНК.

Образцы ядерной ДНК русского осетра были проанализированы по пяти микросателлитным локусам An20, Afug41, Afug51, AoxD165, AoxD161-1 (табл.1) с флуоресцентными метками. Условия проведения ПЦР были оптимизированы для исследуемого вида *A.gueldenstadtii* [13-14].

Амплификацию STR-локусов проводили в два этапа. Первый этап: денатурация при 94°C – 2 мин, затем диапазон уменьшения температуры отжига праймеров до 58-65°C, 7 циклов, второй этап – денатурация при 90°C – 20 сек., диапазон уменьшения температуры отжига праймеров до 54-65°C, 40 циклов, повышение температуры до 70°C – 40 сек., снижение температуры до 10°C – 15 секунд. Амплифицированные продукты подвергали капиллярному электрофоретическому разделению с помощью системы капиллярного электрофореза ABI-3500 Genetic Analyzer (Applied Biosistem, USA), определяя длины фрагментов ДНК с использованием компьютерной программы GeneMapper 4.1.

Оценку количества и частот аллелей осуществляли с применением программного обеспечения Structure 2.3.3 [15]. Достоверность различий значений между частотами аллелей в изучаемых выборках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента [16]. Наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности рассчитывали по величинам частот аллелей с помощью MS Excel 2010 [17]. Генетическое равновесие Харди-Вайнберга в популяции тетраплоидных видов вычисляли по Айала (1984) [17]. Отклонение фактических частот генотипов от ожидаемых из соотношения Харди-Вайнберга оценивали с помощью χ² [18]. Индекс фиксации Райта (F), отражающий уровень инбридинга, рассчитывали согласно Райту [19-20].

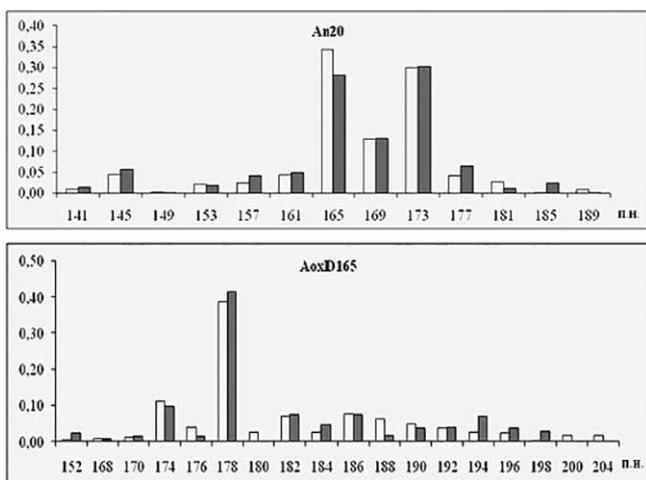


Рисунок 2. Распределение частот аллелей в микросателлитных локусах An20, AoxD165 у русского осетра (по осям ординат – относительные аллельные частоты)

Результаты и их обсуждения |

По литературным данным, у особей русского осетра из Каспийского моря выявлены два митоти-

па мтДНК – типичный русский осетр (GUE) и «baerii-like» (BL), митотип «BL» отмечен у около 30% особей [6; 12; 21].

Результаты наших исследований выявили митотип «GUE» у 73,85% особей русского осетра с Северного Каспия, митотип «BL» отмечен у 26,15% рыб. Частота встречаемости митотипа «GUE» у осетров, отловленных в средней части Каспийского моря, составила 80,2%, митотипа «BL» – 19,8%.

Молекулярно-генетический анализ пяти микросателлитных локусов (An20, Afug41, Afug51, AoxD165, AoxD161-1) у русского осетра, выловленного в Северном и Среднем Каспии, выявил 88 и 68 аллелей соответственно. Все локусы были полиморфными. Число аллелей на локус варьировало от 13 (An20) до 23 (Afug41) в выборке рыб с Северного Каспия. В Среднем Каспии количество аллелей было в диапазоне от 10 (Afug51) до 19 (Afug41) (табл. 2). На рис. 2 представлены диаграммы распределения частот аллелей в локусах An20 и AoxD165 у русского осетра с Северного и Среднего Каспия.

У особей с Северного и Среднего Каспия локус An20 был представлен 13 аллелями в диапазоне от 141 п.н. до 189 п.н. В обеих выборках доминировали аллели размером 165 п.н. (с частотой 0,28-0,34) и 173 п.н. (с частотой 0,30-0,31) (рис. 2, табл. 2).

Наиболее полиморфным оказался локус Afug41 для обеих выборок рыб. Обнаружено 23 аллеля у осетров с Северного Каспия с аллельным рангом 173-265 п.н. У рыб из Среднего Каспия выявлено 19 аллелей

в диапазоне 173-257 п.н. (табл. 2). Максимальные относительные частоты (0,19-0,27) встречаемости зарегистрированы для аллеля 197 п.н.

В локусе Afug51 ядерной ДНК у русского осетра, выловленного в Северном Каспии, зарегистрировано 19 аллелей в диапазоне 208-288 п.н., в Среднем Каспии отмечено 10 аллелей от 212-276 п.н. (табл. 2). Доминировали аллели размером 232 п.н. в обеих выборках, где они были представлены с частотой 0,24-0,30.

Аллельный ранг локуса AoxD165 в ядерной ДНК русского осетра, отловленного в северной части Каспийского моря был представлен 18 аллелями и находился в пределах 152-204 п.н. У осетров со средней части моря зафиксировано 15 аллелей в диапазоне 152-198 п.н. У всех исследованных русских осетров максимальная частота встречаемости (0,39-0,41) отмечена у аллеля 178 п.н. (рис. 2, табл. 2).

В локусе AoxD161-1 у рыб отмечено 15 аллелей в диапазоне 276-336 п.н. в Северном Каспии и 11 аллелей в диапазоне 288-328 п.н. в Среднем Каспии (табл. 2). Аллели размером 316 п.н. доминировали и были зарегистрированы с частотой 0,17-0,18 в обеих выборках русского осетра (табл. 2).

У обеих выборок русского осетра из Каспийского моря, при анализе распределения аллельных частот, статистически значимых различий по t-критерию Стьюдента не выявлено (p=0,05).

В выборке особей с Северного Каспия значение наблюдаемой гетерозиготности составило 0,918-

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия русского осетра в Каспийском море

Локусы	Северный Каспий				Средний Каспий			
	L	He	Ho	F	L	He	Ho	F
An20	13	0,840	0,978	-0,164	13	0,782	0,998	-0,276
Afug41	23	0,930	0,989	-0,063	19	0,824	0,998	-0,211
Afug51	19	0,880	0,929	-0,056	10	0,775	0,896	-0,156
AoxD165	18	0,860	0,918	-0,067	15	0,738	0,930	-0,260
AoxD161-1	15	0,900	0,981	-0,090	11	0,876	0,999	-0,140
Среднее	-	0,882±0,015	0,959±0,015	-	-	0,799±0,024	0,964±0,022	-
Общее	88	-	-	-	68	-	-	-

L – количество идентифицированных аллелей; He – ожидаемая гетерозиготность; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; F – индекс фиксации Райта

Таблица 3. Соответствие наблюдаемых численностей генотипов русского осетра ожидаемым из равновесия Харди-Вайнберга в Каспийском море

Локус	Северный Каспий		Средний Каспий	
	d.f.	χ ²	d.f.	χ ²
An20	10	13,04*	10	6,33*
Afug41	20	1,94*	16	3,7*
Afug51	16	1,5*	7	2,02*
AoxD165	15	2,2*	12	5,62*
AoxD161-1	12	3,91*	8	1,64*

d.f. – число степеней свободы; * Наблюдаемые численности генотипов соответствуют ожидаемым (p=0,95)



0,989 и было близко к ожидаемой гетерозиготности 0,840-0,930. В Среднем Каспии у русского осетра уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o), по всем исследованным локусам, составил 0,896-0,999 и был выше ожидаемой (0,738-0,876) (табл. 2).

Индекс фиксации Райта (F) по пяти локусам принимал отрицательные значения, отражающие отсутствие дефицита гетерозигот в популяции [22] и, следовательно, отсутствие инбридинга у предыдущих поколений исследованных выборок русского осетра в Каспийском море. У русских осетров с Северного Каспия индекс F был близок к нулю (от -0,056 до -0,164) по сравнению с выборкой из Среднего Каспия (от -0,140 до -0,276), что свидетельствует о более выраженном избытке гетерозигот в средней части моря (табл. 2).

Популяционный анализ русского осетра из Каспийского моря показал соответствие соотношению генотипов равновесию Харди-Вайнберга по

пяти локусам. Проверка соответствия наблюдаемых частот генотипов, теоретически ожидаемым в обеих исследованных выборках по всем локусам с использованием χ^2 -критерия, оказалась достоверной, с вероятностью $p=0,95$ (табл. 3).

Полученные нами результаты по исследованию митотипов мтДНК выявили митотип «VL» у менее 30% русского осетра с Северного и Среднего Каспия, что согласуется с данными, полученными ранее [6; 12; 22].

Сравниваемые выборки русского осетра каспийской популяции в целом имели высокий уровень полиморфизма. Наибольшее аллельное разнообразие по всем локусам выявлено у рыб с Северного Каспия, что связано с численностью выборки. При сравнении аллельного набора пяти локусов ядерной ДНК русского осетра, выловленного в Северном и Среднем Каспии, доминировали одинаковые аллели. Максимальные частоты встречаемости аллелей у обеих выборок рыб по пяти



в Каспийское море выпущено около 2,2 млрд молоди осетровых (более 70%) с заводов России [1; 2]. При этом необходимо учитывать, что выпускаемая молодь может оказаться генетически не разнообразной из-за отсутствия на заводах контроля генетического родства особей, при составлении схем скрещивания в период нерестовых кампаний.

Закон генетического равновесия Харди-Вайнберга отражает процессы случайного скрещивания при достаточно высокой численности особей в популяции и жизнеспособность популяции [18]. У особей с Каспийского моря отмечено достоверное соответствие ($p=0,95$) соотношения генотипов равновесию Харди-Вайнберга по пяти локусам, что объясняется тетраплоидной организацией генома русского осетра [6; 24].

| Заключение |

Таким образом, у русского осетра выявлены два митотипа мтДНК - «GUE» и «VL». Частота встречаемости митотипа «VL» была ниже 30,0%, что является маркером каспийской популяции. Установлены высокие уровни аллельного полиморфизма по микросателлитным локусам и высокая степень гетерозиготности у русского осетра, выловленного в северной и средней частях Каспийского моря. Максимальные частоты встречаемости аллелей у обеих выборок русского осетра по всем пяти исследованным локусам были идентичными и соответствовали видоспецифичным аллелям. В обеих исследованных выборках отсутствовал дефицит гетерозигот, и, следовательно, инбредные процессы. У исследованных особей отмечено соответствие соотношению генотипов равновесию Харди-Вайнберга по пяти локусам с вероятностью $p=0,95$.

исследованным локусам соответствовали видоспецифичным аллелям для русского осетра [8].

Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности, характеризующие генетическое разнообразие особей русского осетра, выловленного в Северном и Среднем Каспии, были высокими. Значение наблюдаемой гетерозиготности в исследованных локусах было близко к ожидаемой, что свидетельствует о состоянии гетеро- и гомозигот, близком к равновесному.

По результатам расчета индекса фиксации Райта избыток гетерозигот более выражен у рыб со Среднего Каспия. Небольшой эксцесс гетерозигот в Северном Каспии, вероятно, связан с влиянием генетического материала молоди, выращенной в условиях аквакультуры и выпущенной в естественную среду с рыбоводных заводов. Популяции осетровых в Северном Каспии формируются в результате работы волжских осетровых рыбоводных заводов (ОРЗ) [23]. За период 1954-2011 гг.

| ЛИТЕРАТУРА |

1. Ходоревская Р.П., Калмыков В.А. Формирование популяций осетровых (ACIPENSERIDAE) Волго-Каспийского бассейна // Вопросы ихтиологии. 2014. Т. 54. Вып. 5. С. 584-590.
2. Ходоревская Р.П., Калмыков В.А., Жилкин А.А. Современное состояние запасов осетровых каспийского бассейна и меры по их сохранению // Вестник АГТУ. 2012. № 1. С. 99-106.
3. Рябова Г.Д., Климонов В.О., Шишанова Е.И. Генетическая изменчивость природных популяций и domestцированных стад осетровых России (атлас аллозимов). М: Россельхозакадемия, 2008. 94 с.
4. Мирзоян А.В., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Чистяков В.А. Генетическое разнообразие азовских популяций русского осетра и северюги: мониторинг и сохранение при искусственном воспроизводстве // Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов: материалы Первой Международ. научно-практич. конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2006. С. 126-127.
5. Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C. et al. Genome duplication events and functionfl reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus) // Genetics. 2001. V. 158. P. 1203-1215.
6. Тимошкина Н.Н., Барминцева А.Е., Усатов А.В., Мюге Н.С. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (Acipenser gueldenstaedtii) // Генетика. 2009. Т. 45. № 9. С. 1250-1259.
7. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полимор-



физма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика. 2010. Т. 8. № 1. С. 12-24.

8. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения // Генетика. 2013. Т. 4. № 9. С. 1093-1105.

9. Базелюк Н.Н., Козлова Н.В., Макарова Е.Г., Дубовская А.В., Шемякина Е.В., Головинова С.А., Файзулина Д.Р., Карыгина Н.В., Попова О.В. Физиологические и генетические исследования стерляди (*Acipenser ruthenus*) в современных экологических условиях // Рыбное хозяйство. 2014. № 3. С. 29-32.

10. Макарова Е.Г., Козлова Н.В., Базелюк Н.Н. Исследование генетического разнообразия северюги (*Acipenser stellatus*) Северного Каспия в 2012-2014 гг. // Рыбное хозяйство. 2015. № 4. С. 70-74.

11. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt – extraction of high quality gnomonic DNA for PCR – based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25 (20). P. 4692-4693.

12. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М. и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т. 44. С. 931-917.

13. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecol. Not. 2002. V. 2. P. 586-588.

14. Welsh A.B., Blumberg M., May B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecol. Notes. 2003. V. 3. P. 47-55.

15. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945-959.

16. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 343 с.

17. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. М.: Мир, 1984. 230 с.

18. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.

19. Wright S. The genetical structure of population // Ann.Eugen. 1951. V. 15. P. 323-354.

20. Long J.C. The allelic correlation structure of Gainj and Kalam speaking peopke. The estimation and interpretation of Wrights F-statistics // Genetics. 1986. V. 112. P. 629-647.

21. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // Ecol. Lett. 2000. V. 3. P. 503-508.

22. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure // Evolution. 1984. V. 38(6). P. 1358-1370.

21. Судаков Г.А., Власенко А.Д., Ходоревская Р.П. Состояние запасов водных биологических ресурсов Каспийского бассейна и меры по их сохранению в условиях развития нефтедобычи // Проблемы сохранения экосистемы в условиях освоения нефтегазовых месторождений: матер. Третьей междунард. научно-практич. конф. (Астрахань, 13-15 октября 2009 г.). Астрахань: КаспНИРХ, 2009. С. 200-204.

22. Soltis D.E., Soltis P.S. The dynamic nature of polyploidy genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 8089-8091.



THE GENETIC DIVERSITY OF RUSSIAN STURGEON (*ACIPENSER GULDENSTAEDTII*) IN THE CASPIAN SEA

Kozlova N.V., PhD, **Makarova E.G.**, PhD, **Bazeljuk N.N.**, PhD – Caspian Fisheries Research Institute, e-mail: kaspiy-info@mail.ru

The results of the Russian sturgeon genetic diversity researches in the Caspian Sea, performed via nuclear (microsatellite locus An20, Afug41, Afug51, AoxD165, AoxD161-1) and mitochondrial markers (PCR-identification of mitotypes) are presented. In the Caspian Sea the high levels of genetic polymorphism are identified. The absence of heterozygote deficiency is noted. Mitotype «BL» is observed in less than 30% of the individuals.

Keywords: Russian sturgeon, microsatellite locus, observed and expected heterozygosity, polymorphism