

УДК 575.22

RAPD АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ АЗОВСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ СЕВРЮГИ (*ACIPENSER STELLATUS*) И РУССКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTI*)

© 2008 г. В.А. Чистяков, Н.Н. Тимошкина, Е.Т. Рынза, А.В. Мирзоян, Н.В. Войнова
Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Ростов-на-Дону 344002

Поступила в редакцию 24.04.2007 г.

Окончательный вариант получен 02.08.2007 г.

Оценка генетической вариабельности азовских популяций севрюги и русского осетра проведена с использованием метода RAPD-ПЦР. Предложены рекомендации по ее сохранению.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время очевидно, что разработка грамотной стратегии воспроизводства и сохранения осетровых рыб, в условиях резкого падения их численности в Азовском бассейне, должна основываться на достоверной научной информации о генетической структуре сохраняемых популяций. Последнее определяет наиболее важный при планировании восстановительных мероприятий параметр – минимальное количество особей, необходимое для участия в воспроизводстве популяции без потери генетического разнообразия.

В 1990 г. Дж. Вильямс с соавторами описали метод анализа генетического полиморфизма RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), основанный на амплификации участков ДНК с помощью одного праймера произвольной нуклеотидной последовательности (Williams et al., 1990). В настоящее время накоплен достаточно богатый материал по RAPD-анализу широкого спектра таксонов, от высших растений и млекопитающих до дрозофилы. Высокий уровень выявляемого полиморфизма обеспечил широкое применение RAPD-PCR в популяционно-генетических исследованиях, для выявления скрытой генетической изменчивости в линиях и близкородственных видах, а также для индивидуальной идентификации. Хотя по точности RAPD-PCR уступает методам, связанным с оценкой изменчивости микросателлитных локусов и мононуклеотидного полиморфизма, простота и высокая информативность определяет актуальность его использования, особенно в практических целях.

В 1999 г. Л.А. Животовским предложен математический аппарат для получения несмещенных оценок частоты аллелей на основе RAPD-PCR, что позволяет обрабатывать полученные данные при помощи общепринятых формул популяционной генетики (Zhivotovsky, 1999).

Задачей наших исследований являлось использование молекулярно-генетических и статистических методов для оценки генетического разнообразия азовских популяций русского осетра и севрюги в целях повышения эффективности их промышленного воспроизводства и сохранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили зафиксированные в этаноле фрагменты плавников 153-х особей русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) и 133-х особей

севрюги (*Acipenser stellatus*) из генетической коллекции АзНИИРХ, принадлежащих к поколениям 1978-2000 гг.

ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из 10-50 мг ткани (Макаров и др., 2001).

После предварительного исследования 10-ти праймеров, различающихся по размеру и нуклеотидному составу, был выбран один – ОРА05 (5'-ААGGGTCTTG-3') («ООО Синтол», РФ), позволивший получить воспроизводимые, полиморфные спектры с наибольшим количеством хорошо идентифицируемых бэндов.

Математическую обработку изображений проводили при помощи программы «Phoretix» 1D Database («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

На основе полученных электрофореграмм строили бинарные матрицы. При этом наличие электрофоретических полос (бэндов) обозначали «1», отсутствие – «0». Общепринято, что RAPD-маркеры ведут себя как доминантные аллели, поэтому не возможно установить, соответствует ли данная амплифицированная полоса гомозиготному или гетерозиготному генотипу. Однако, можно идентифицировать гомозиготные нуль-аллели, которые характеризуются отсутствием полосы на спектре. Для получения несмещенных оценок частоты рецессивного нуль-аллеля и гетерозиготности использовали формулы Животовского (Zhivotovsky, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены RAPD-спектры, полученные для русского осетра и севрюги. Учитывались полосы (бэнды) средней части спектра, как наиболее четкие. Статистическая обработка была проведена по 61-му бэнду, хорошо дифференцирующемуся на спектрах русского осетра, и по 53-м бэндам спектров севрюги. Используемый праймер ОРА05 позволил выявить 5 мономорфных локусов в фингерпринтах осетра и 8 – севрюги. Хорошо различающиеся на общей картине геля по интенсивности и молекулярной массе, они могут быть использованы для видовой идентификации. Наряду с фрагментами, встречающимися в паттернах многих особей, имелись также уникальные бэнды – маркеры отдельных особей.

Средняя гетерозиготность исследованной выборки русского осетра составила $0,338 \pm 0,132$, севрюги – $0,281 \pm 0,146$, что попадает в интервал, характерный для этого показателя, определенного по RAPD для целого ряда неродственных видов (Артюкова, 2004; Mamuris, 1999).

Для оценки возможного временного тренда средней гетерозиготности русского осетра сравнивали этот показатель для 27 особей поколений 1978-1983 гг. и 27 особей поколений 1993-2000 гг. Полученные величины $0,355 \pm 0,135$ и $0,316 \pm 0,137$ соответственно статистически достоверно не отличались, что не подтверждает существования вышеназванного тренда. Интересно, что, несмотря на уменьшение объема выборок поколений 1978-1983 гг. и 1993-2000 гг., по сравнению с общей выборкой, величины стандартных ошибок соответствующих значений гетерозиготности практически не отличаются. Это, по-нашему мнению, указывает на существование тенденции к сходству по уровню гетерозиготности у близких поколений.

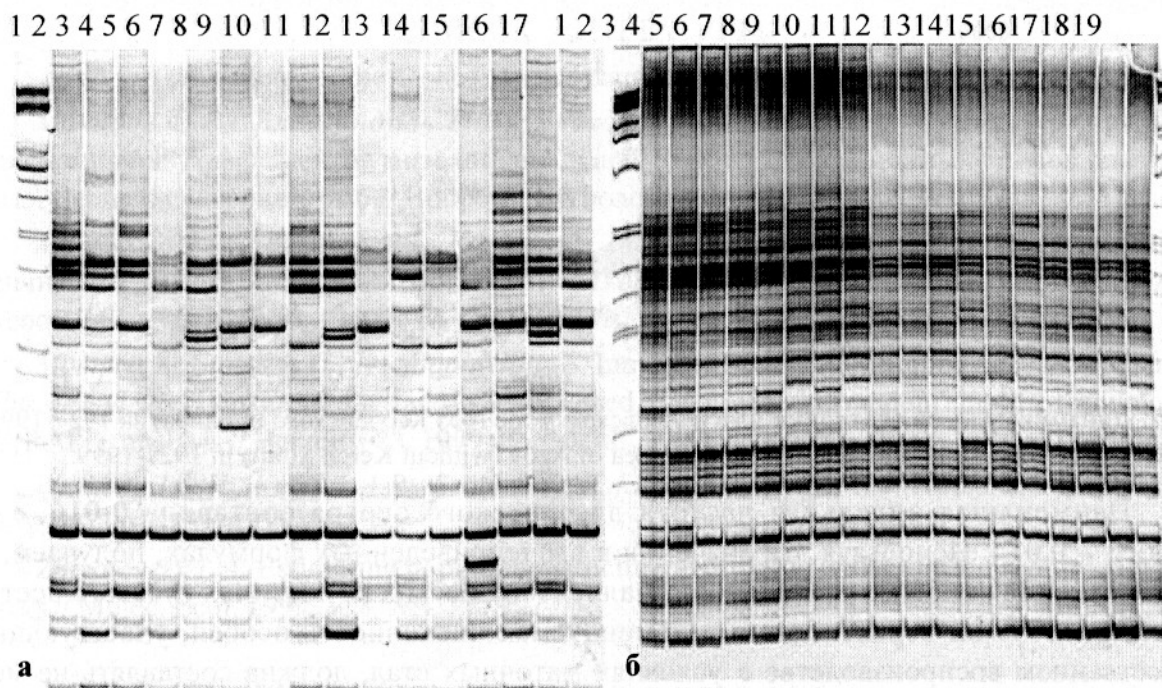


Рис. 1. RAPD-спектры ДНК русского осетра (а) и севрюги (б), праймер OPA05.

1 – маркер молекулярной массы.

Fig. 1. RAPD-specters of DNA of Russian sturgeon (a) and sevruga (б), primer OPA05. 1 – Ladder.

По оценкам ФГУП «АзНИИРХ», на конец 2006 г. запасы азовской популяции русского осетра составили 218 т (против 8 тыс. т в 1997 г.). Численность севрюги оценивается в 200-400 экз. взрослых рыб. Общее падение численности популяций азовских осетровых отразилось не только на падении уловов (рис. 2), но и привело к дефициту производителей для рыбоводных заводов. В сложившихся условиях главной популяционно-генетической задачей системы промышленного воспроизводства осетровых является сохранение уровня их генетической гетерогенности. Практически эта задача сводится к сохранению самого низкочастотного маркера, выявляемого при исследовании репрезентативной выборки.

Определить эффективную численность популяции, необходимую для сохранения маркера с известной частотой, можно воспользовавшись фундаментальным положением популяционной генетики о биномиальном распределении частот аллелей в панмиктической популяции. В этом случае частота маркера у потомства с вероятностью 95% попадает в интервал: $q \pm 1,96 \sqrt{\frac{(1-q)q}{2n}}$, с вероятностью 99% – в интервал $q \pm 2,58 \sqrt{\frac{(1-q)q}{2n}}$, где q – частота маркера в родительской популяции; n – эффективная численность популяции.

Положительное значение нижней границы доверительного интервала является необходимым условием передачи маркера потомству с требуемой вероятностью:

$$q - 1,96 \sqrt{\frac{(1-q)q}{2n}} > 0, \quad q - 2,58 \sqrt{\frac{(1-q)q}{2n}} > 0. \text{ Преобразуем неравенства относительно эффективной численности: } n(95\%) > \frac{3,84(1-q)}{2q}, \quad n(99\%) > \frac{6,66(1-q)}{2q}.$$

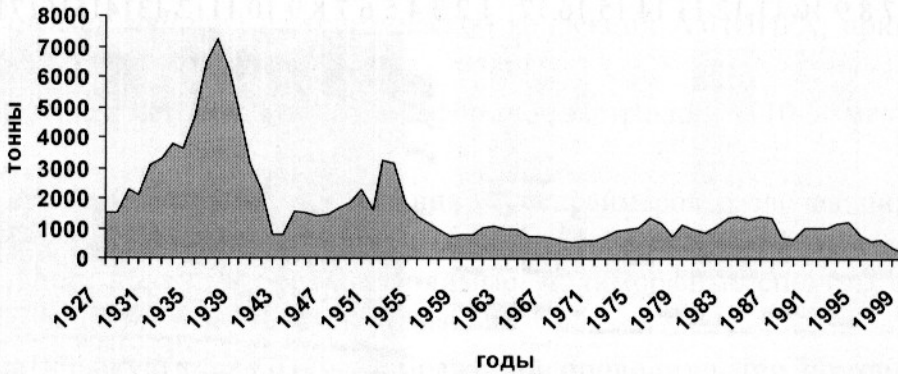


Рис. 2. Динамика уловов осетровых рыб в Азовском море (без Керченского пролива) за 1927-1999 гг.
Fig. 2. Catch dynamics of sturgeon fishes in the Sea of Azov (without Kerch Strait) in 1927-1999.

Наименьшая аллельная частота для русского осетра составила 0,016, а для севрюги – 0,014. Используя эти значения в вышеприведенных формулах, получаем, что для сохранения наиболее редкого RAPD-аллеля в азовских популяциях русского осетра и севрюги с 99%-ой вероятностью рекомендуемая численность особей, участвующих в искусственном воспроизводстве в условиях маточных стад, должна составлять не менее 235 особей для севрюги и не менее 205 особей для осетра.

В настоящее время, эффективным средством сохранения и спасения природных популяций считается создание криобанков генетических ресурсов. Несомненными преимуществами криобанков по сравнению с традиционными природоохранными мероприятиями являются, в частности, возможность содержать в неволе меньшее число особей одного вида, что обеспечивает содержание представителей большего числа видов, сведение до минимума эффектов генетического дрейфа и инбридинга, сохранение видов в случае эпидемий, экологических и социальных катастроф.

Поскольку консервируемые в криобанке половые продукты являются гаплоидными, для сохранения существующего на момент отбора генетического разнообразия требуется отбор вдвое большего числа образцов, чем при отборе рыб в маточное стадо. При этом, даже в случае оплодотворения полностью гомозиготных самок или одной самки, вероятность сохранения наиболее редкого аллеля будет соответствовать расчетным значениям.

На основании полученных статистических данных для сохранения при помощи криобанка выявленной генетической гетерогенности необходимо законсервировать сперму более чем 410 самцов русского осетра и 470 севрюги. Эффективность реальных мероприятий по реализации генетической информации, хранящейся в криобанках, будет зависеть от гетерогенности использованного стада самок, а также от схемы скрещиваний. Этим вопросам будет посвящен ряд наших следующих публикаций.

Таким образом, молекулярно-генетические и математические методы могут быть эффективно использованы в промышленном воспроизводстве и сохранении осетровых рыб.

Выражаем благодарность сотрудникам центра молекулярно-генетической идентификации гидробионтов (ЦМГИ, ФГУП «ВНИРО», Москва) и лично В.А. Барминцеву за неоценимую помощь в проведении работы и обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. С. 290-313.
- Макаров Э.В., Александров И.Д., Александрова М.В. и др. Сравнительная ПЦР-амплификация двух фрагментов митохондриальной ДНК из коллекционных спилов плавников и мягких тканей осетровых рыб // Вопросы ихтиологии. М., 2001. Т. 41. №4. С. 538-541.
- Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. №7. С. 877-884.
- Mamuris Z., Stamatis C., Triantaphyllidis C. Intraspecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) in the Mediterranean Sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // Heredity. 83. 1999. Pp. 30-38.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. Nucleic Acids Research. 1990. V. 18. Pp. 6531-6535.
- Zhivotovsky L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Molec. Ecol. 1999. V. 8. №4. Pp. 907-913.

**GENETIC DIVERSITY OF THE AZOV SEA POPULATIONS OF SEVRUGA
(*ACIPENSER STELLATUS*) AND RUSSIAN STURGEON (*ACIPENSER
GUELLENSTAEDTII*) ON THE BASIS OF RAPD ANALYSIS**

© 2008 y. V.A. Chistyakov, N.N. Timoshkina, E.T. Rynza, A.V. Mirzoyan, N.V. Voynova

Research Institute of the Azov Sea Fishery Problems, Rostov-on-Don

Genetic diversity of the Azov sea populations of sevruga and Russian sturgeon was estimations by RAPD-PCR methods and recommendations on its preservation are given.