

УДК 597.442-115:639.371.2  
ББК [47.294:47.285]:28.693.324-4

*Н. В. Козлова, Н. Н. Базелюк, Д. Р. Файзулина, Е. В. Стоногина*

## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В АКВАКУЛЬТУРЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

*N. V. Kozlova, N. N. Bazelyuk, D. R. Faizulina, E. V. Stonogina*

## USE OF MOLECULAR AND GENETIC RESEARCHES OF STURGEON AQUACULTURE

Проведен анализ генетического разнообразия по ядерным (микросателлиты) ДНК-маркерам производителей русского осетра в условиях аквакультуры. У всех проанализированных рыб по пяти исследованным локусам (An 20, Afug 41, Afug 51, AoxD 165, AoxD 161) выявлено 74 аллеля. Наибольший аллельный полиморфизм наблюдался в локусах Afug 41, AoxD 161. Отмечена высокая степень гетерозиготности производителей русского осетра, используемых в искусственном воспроизводстве осетровых рыб.

**Ключевые слова:** русский осетр, микросателлиты, аллели, полиморфизм, гетерозиготность.

The analysis of genetic diversity on the nuclear (microsatellites) DNA markers of the Russian sturgeon manufacturers in aquaculture conditions is made. All of the analyzed fish in five studied loci (An 20, Afug 41, Afug 51, AoxD 165, AoxD 161) revealed 74 allele. The highest allelic polymorphism was observed in 41 loci Afug, AoxD 161. The high degree of heterozygosity of Russian sturgeon manufacturers, used in the artificial reproduction of sturgeon, is marked.

**Key words:** Russian sturgeon, microsatellite, allele, polymorphism, heterozygosity.

### Введение

В настоящее время в России и других странах распространена практика одомашнивания и искусственного выращивания осетровых рыб. В сложившейся ситуации необходимо применение наиболее современных и совершенных способов мониторинга генетических процессов, протекающих в искусственно воспроизводимых популяциях и промышленных стадах осетровых рыб. Результаты молекулярно-генетических анализов должны ложиться в основу подбора пар производителей для скрещивания, селекции и получения жизнестойкого потомства с наименьшим отходом на стадиях развития и выращивания [1–3].

Молекулярно-генетические исследования рыб позволяют достоверно определить таксономическую принадлежность каждой особи и составить индивидуальные генетические паспорта. Основным показателем в генетическом паспорте являются микросателлитные маркеры, определяющие индивидуальность каждой особи, что важно для подбора пар производителей при скрещивании для получения эффекта гетерозиса, повышения выживаемости личинок и мальков осетровых рыб и, соответственно, повышения качества товарного выращивания.

Микросателлитные локусы – это полиморфные последовательности ДНК, содержащие короткие повторяющиеся последовательности нуклеотидов. Микросателлитные локусы распределены по консервативным, мало изменяющимся регионам ДНК геномов и могут демонстрировать высокие уровни внутривидового аллельного полиморфизма. Уникальные последовательности ДНК, расположенные по границам фланкирующих повторов, могут быть использованы для идентификации и дальнейшей характеристики геномных регионов, окружающих эти локусы [4].

Целью исследований было выявление генетического разнообразия domesticiрованных стад русского осетра (*Acipenser güldenstädtii*) на научно-экспериментальной базе Каспийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства (НЭБ КаспНИРХ) – центр «БИОС». Для достижения поставленной цели был проведен анализ генетического разнообразия русского осетра по пяти микросателлитным локусам ядерной ДНК.

### Материал и методы исследования

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили пробы 31 фрагмента плавинок производителей русского осетра (*Acipenser güldenstädtii*) (20 экз. самок, 11 экз. самцов).

Тканевые пробы плавников рыб отбирали прижизненно, фиксировали в 96 %-м этаноле и хранили в морозильной камере.

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов плавников методом солевой экстракции [5].

Микросателлитный анализ ядерной ДНК проводили методом, первоначально разработанным для видов *A. naccarii* [6], *A. fulvescens* [7] и *A. oxyrinchus* [8] по пяти микросателлитным локусам: An 20, Afug 41, Afug 51, AoxD 165, AoxD 161 с флюоресцентными метками (табл.). Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были оптимизированы для исследуемого вида *A. güldenstädtii*.

Реакционная смесь ПЦР для микросателлитного анализа (STR) объемом 15 мкл состояла из следующих компонентов: реакционный буфер – 10 мМ (Силекс, Москва); MgCl<sub>2</sub> – 25 мМ (Силекс, Москва); dNTPs – 2,5 мМ (Силекс, Москва); термостабильная полимеразы – 5,0 U (Силекс, Москва); праймеры – 10 Пмоль (Applied Biosistem, USA), ДНК – 3 мкл; деионизированная вода (milliQ) до полного объема.

Аmplификация ДНК, выделенной из образцов, осуществлялась в термоциклере BIORAD C-1000.

#### Локусы для микросателлитного анализа

Локус	Последовательность (5'-3')	Размер аллелей, п. н.
An 20	F:AATAACAATCATTACATGAGGCT R:TGGTCAGTTGTTTTTTATTGAT	129–187
Afug 41	F:TGACGCACAGTAGTATTATTATG R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	173–265
Afug 51	F:ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT R:ATTCCGCTTGCGACTTATTTA	188–278
AoxD 165	F:TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC R:AAAGCCCTACAACAATGTCAC	140–208
AoxD 161	F:CATTCAGTATGAGACAGACACTC R:ATCTCAGGGACTGCTGTGATTGG	280–360

При проведении микросателлитного анализа ПЦР-продукты подвергали капиллярному электрофоретическому разделению, STR-спектры ядерной ДНК анализировали на приборе Genetic Analyzer 3500 с использованием компьютерной программы «Gene Mapper».

Для каждого микросателлитного локуса были определены число аллелей и их размер – пары нуклеотидов (п. н.) в соответствии с капиллярной электрофоретической подвижностью ПЦР-продукта.

Генетическую гетерогенность выборок оценивали по частоте встречаемости аллелей в локусе, уровню наблюдаемой гетерозиготности –  $H_0$  [9].

#### Результаты исследований и их обсуждение

Микросателлитный анализ локусов ядерной ДНК осетровых рыб позволяет оценить генетическое разнообразие осетровых рыб, выявить индивидуальные особенности рыб и, соответственно, повысить продуктивные качества выращиваемой товарной рыбы.

Полиморфность, гетерозиготность, разнообразие комбинаций аллелей определяют богатство генофонда вида.

Чем выше уровень гетерозиготности, тем больше количество различных сочетаний аллелей у потомства. Уменьшение численности вида естественно ведет к сокращению аллельного разнообразия и количества комбинаций, поэтому важно сохранить генофонд диких видов, не допуская их резкого обеднения.

У всех проанализированных производителей русского осетра, содержащихся на НЭБ КаспНИРХ – центр «БИОС» по пяти исследованным локусам выявлено 74 аллеля. Число аллелей на локус колебалось от 11 (An 20) до 19 (AoxD161). Наибольший полиморфизм проявили локусы Afug 41 и AoxD 161 с размерными диапазонами аллелей 173–253 и 284–336 п. н. соответственно. Наименее полиморфным в выборке оказался локус An 20 с размерным диапазоном 145–189 п. н.

Результаты исследования геномной ДНК у осетров выявили преобладание в локусах An 20 аллеля 165 п. н. (33 %), в Afug 41 – 197 п. н. (21 %), в Afug 51 – 232 п. н. (30 %), в AoxD 165–178 п. н. (37 %), в AoxD 165–316 п. н. (15 %) (рис. 1, 2).

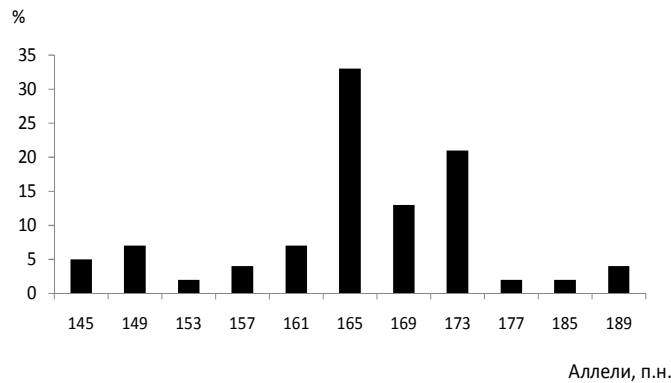


Рис. 1. Распределение аллелей локуса An 20 в ядерной ДНК производителей русского осетра

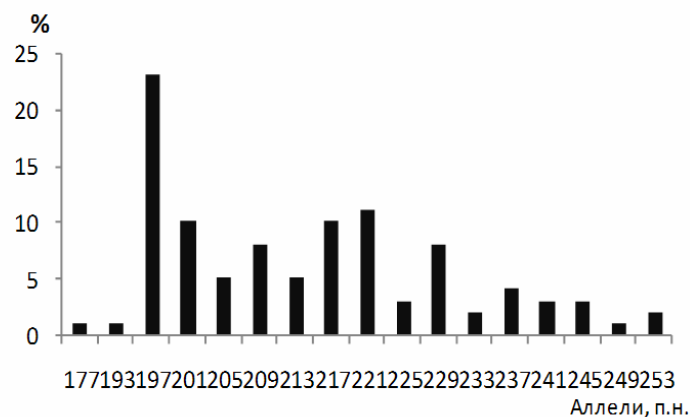


Рис. 2. Распределение аллелей локуса Afug 41 в ядерной ДНК производителей русского осетра

Анализ генетического разнообразия производителей русского осетра выявил высокие значения наблюдаемой гетерозиготности ( $H_0$ ) по микросателлитным локусам от 0,935 до 1,0, что свидетельствует о высокой степени гетерозиготности исследованных особей. Средняя гетерозиготность и число аллелей на локус характеризуют уровень генетического разнообразия, от которого зависит интенсивность процессов, протекающих в природных популяциях, и выживаемость популяции. Генетическое разнообразие или генетический полиморфизм (один из компонентов генетической характеристики популяции или вида) имеет большое значение для экологической пластичности популяции, позволяет популяции адаптироваться к изменяющимся условиям среды обитания.

По пяти микросателлитным локусам проведена паспортизация исследованных производителей русского осетра, использованных в искусственном воспроизводстве.

Данные индивидуального генетического паспорта рыбы вносятся в общую базу данных. При необходимости, по образцу икры или плавника можно определить принадлежность не просто к тому или иному виду, а к хозяйству, где была получена рыба, и подтвердить, от какой рыбы получена икра или продукция.

### Заключение

Анализ генетического разнообразия производителей русского осетра по микросателлитным локусам (An 20, Afug 41, Afug 51, AoxD 165, AoxD 161) выявил 74 аллеля. Число аллелей на локус варьировало от 11 (An 20) до 19 (AoxD161). Показатели наблюдаемой гетерозиготности ( $H_0$ ) в диапазоне от 0,935 до 1,0 свидетельствует о высоком генетическом разнообразии

производителей русского осетра, участвующих в искусственном воспроизводстве на НЭБ КаспНИРХ – центр «БИОС».

Генотипирование производителей осетровых, потомство которых выпускают в естественную среду, позволяет оценить вклад НЭБ КаспНИРХ – центр «БИОС» в сохранение разнообразия естественной популяции осетровых.

Разноплановые комплексные молекулярно-генетические исследования необходимы для сохранения генофонда и развития осетроводства. Эти методы эффективны, перспективны в аквакультуре осетровых рыб и доказывают необходимость их использования на осетровых рыбных заводах Волжско-Каспийского бассейна для определения вклада каждого предприятия в пополнение запасов Каспийского бассейна.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллендорф Ф. У. Генетика и управление рыбным хозяйством / Ф. У. Аллендорф, Н. Рима, Ф. М. Агтер / Популяционная генетика и управление рыбным хозяйством. М.: Агропромиздат, 1991. С. 15–36.
2. Рябова Г. Д. Генетическая изменчивость природных популяций и доместцированных стад осетровых России (атлас аллозимов) / Г. Д. Рябова, В. О. Климонов, Е. И. Шишанова. М.: Россельхозакадемия, 2008. 94 с.
3. 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. С. 1–7.
4. Waldbieser G. C. A Microsatellite-Based Genetic Linkage Map for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* / G. C. Waldbieser // Aquaculture. 1999. 32. P. 43–49.
5. Aljanabi S. M. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques / S. M. Aljanabi, I. Martinez // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25 (20). P. 4692–4693.
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.
7. Welsh A. B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* / A. B. Welsh, M. Blumberg, B. May // Mol. Ecol. Notes. 2003. Vol. 3. P. 47–55.
8. King T. L. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae / T. L. King, B. A. Lubinski, A. P. Spidle // Cons. Gen. 2001. Vol. 2. 103–119.
9. Айла Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику / Ф. М. Айла. М.: Мир, 1984. 232 с.

#### REFERENCES

1. Allendorf F. U., Riman N., Atter F. M. Genetics and fishery management [Genetics and fishery management]. *Populatsionnaya genetika i upravlenie rybnym khoziaistvom*. Moscow, Agropromizdat, 1991, pp. 15–36.
2. Riabova G. D. Klimonov V. O., Shishanova E. I. *Geneticheskaya izmenchivost' prirodnnykh populatsii i domestitsirovannykh stad osetrovyykh Rossii (atlas allozimy)* [Genetic variability of natural populations and domesticated stock of Russian sturgeon (atlas of Allozymes)]. Moscow, Rossel'khozakademiia, 2008. 94 p.
3. Miuge N. S., Barmintseva A. E., Rastorguev S. M., Miuge V. N., Barmintsev V. A. Polimorfizm kontrol'nogo regiona mitokhondrial'noi DNK vos'mi vidov osetrovyykh i razrabotka sistemy DNK-identifikatsii vidov [Polymorphism of the control region of mitochondrial DNA of eight species of sturgeon and the development of DNA identification of species]. *Genetika*, 2008, vol. 44, pp. 1–7.
4. Waldbieser G. C. A Microsatellite-Based Genetic Linkage Map for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 1999, 32, pp. 43–49.
5. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques. *Nucl. Acids Res.*, 1997, vol. 25 (20), pp. 4692–4693.
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.
7. 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, vol. 3, pp. 47–55.
8. King T. L., Lubinski B. A., Spidle A. P. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae. *Cons. Gen.*, 2001, vol. 2, pp. 103–119.
9. Aila F. *Vvedenie v populatsionnuyu i evoliutsionnuyu genetiku* [Introduction to population and evolution genetics]. Moscow, Mir Publ., 1984. 232 p.

Статья поступила в редакцию 15.07.2013

**ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Козлова Наталья Викторовна** – Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Астрахань; канд. биол. наук; научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики рыб; natali19\_12@mail.ru.

**Kozlova Natalia Victorovna** – Caspian Research Institute of Fisheries, Astrakhan; Candidate of Biology; Researcher of the Laboratory of Physiology and Genetics of Fish; natali19\_12@mail.ru.

**Базельюк Надежда Николаевна** – Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Астрахань; канд. филос. наук; зав. лабораторией физиологии и генетики рыб; bazelyuk2012@yandex.ru.

**Bazelyuk Nadezhda Nickolaevna** – Caspian Research Institute of Fisheries, Astrakhan; Candidate of Philosophy; Head of the Laboratory of Physiology and Genetics of Fish; bazelyuk2012@yandex.ru.

**Файзулина Дина Рубиновна** – Астраханский государственный технический университет; аспирант кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы»; d\_faizulina@mail.ru.

**Faizulina Dina Rubinovna** – Astrakhan State Technical University; Postgraduate Student of the Department "Aquaculture and Aquatic Resources"; d\_faizulina@mail.ru.

**Стоногина Елена Викторовна** – Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Астрахань; старший лаборант-исследователь лаборатории физиологии и генетики рыб; natali19\_12@mail.ru.

**Stonogina Elena Victorovna** – Caspian Research Institute of Fisheries, Astrakhan; Senior Laboratory Assistant-Researcher of the Laboratory of Physiology and Genetics of Fish; natali19\_12@mail.ru.