

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ РУССКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) ИЗ РЕМОНТНО-МАТОЧНЫХ СТАД РЫБОВОДНЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА

А. Г. Лепешков, Е. А. Иванова, С. Н. Кульба, Н. А. Небесихина

*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»),
Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), Ростов-на-Дону
E-mail: ivanova_e_a@azniirkh.ru*

Аннотация. Исследовано генетическое разнообразие производителей русского осетра из ремонтно-маточных стад (РМС) на рыболовных предприятиях Азово-Донского и Азово-Кубанского филиалов ФГБУ «Главрыбвод» в сравнении с данными, полученными для рыб из естественной популяции. В проведенном исследовании отмечено изменение аллельного профиля и частот встречаемости аллелей у производителей русского осетра. Исчезновение и появление редких аллелей (частота встречаемости <5 %) как по краям, так и внутри распределений не имеет какой-либо направленности, а обусловлено генетическим дрейфом (случайными событиями) в выборках с малой эффективной численностью. Кроме того, отмечена тенденция увеличения процента слабых гетерозигот (АААВ) как следствие спонтанного формирования РМС. У производителей из РМС, в отличие от рыб из природной популяции, наблюдается дефицит гетерозигот, что может в дальнейшем неблагоприятно отразиться на качестве выпускаемой молодежи.

Ключевые слова: *Acipenser gueldenstaedtii*, микросателлитные локусы, осетровый рыболовный завод (ОРЗ), ремонтно-маточное стадо (РМС), осетроводство

GENETIC DIVERSITY OF THE RUSSIAN STURGEON (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII*) BREEDERS FROM THE BROODSTOCKS ON THE FISH FARMS OF THE AZOV AND BLACK SEA BASIN

A. G. Lepeshkov, E. A. Ivanova, S. N. Kulba, N. A. Nebesikhina

*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "VNIRO"),
Azov-Black Sea Branch of the FSBSI "VNIRO" ("AzNIIRKH"), Rostov-on-Don
E-mail: ivanova_e_a@azniirkh.ru*

Abstract. Genetic diversity of the Russian sturgeon breeders from the broodstocks at the fish farms of the Azov-Don and Azov-Kuban Branches of FSBI "Glavrybvod" has been studied in comparison with the data, collected from the fish in a natural population. During this research, the changes in allelic profile and allele frequencies in the Russian sturgeon breeders were recorded. Appearance and disappearance of rare alleles (<5 % frequency) both at the edges and within distributions do not display any specific trend and are preconditioned by genetic drift (random fluctuations) in the samples with low effective abundance. Along with this, the tendency for increase in the percentage of "weak" heterozygotes (AAAB) as a result of spontaneous formation of a broodstock has been identified. The breeders from a broodstock, as opposed to the fish from the natural population, show the deficit of heterozygotes, which, in the future, can negatively affect the quality of released juveniles.

Keywords: *Acipenser gueldenstaedtii*, microsatellite loci, fish farms, broodstocks, sturgeon culture

ВВЕДЕНИЕ

Русский осетр (*Acipenser guldenstadtii*) принадлежит к типу хордовые (*Chordata*), классу лучеперые (*Actinopterygii*), подклассу хрящекостные (*Chondrostei*), отряду осетрообразные (*Acipenseriformes*) (Bonaparte, 1831).

С середины 1950-х гг. зарегулирование речного стока свело к минимуму эффективность естественного размножения осетровых видов рыб в бассейне Азовского моря. Вместо этого были разработаны технологии по искусственному воспроизводству русского осетра, севрюги, посредством которых была восстановлена промысловая часть популяции этих видов.

До конца 90-х гг. XX века искусственное воспроизводство базировалось на производителях, заготовленных во время нерестового хода в бассейне Азовского моря.

Начиная с 2000-х гг., промышленный лов осетровых видов рыб в Азово-Черноморском бассейне полностью закрыт в связи с резким сокращением численности популяции. В связи с отсутствием зрелых производителей в море, рыбоводные предприятия были вынуждены приступить к созданию ремонтно-маточных стад.

В настоящее время воспроизводственный процесс преимущественно базируется на производителях, выращенных на предприятиях от «икры».

Для сохранения и восстановления осетровых видов рыб необходимо провести оценку генетического разнообразия производителей из РМС рыбоводных предприятий Азово-Донского и Азово-Кубанского филиалов ФГБУ «Главрыбвод». Наиболее удобным инструментом для изучения генетической структуры популяции на сегодняшний день является микросателлитный анализ. Высокое аллельное разнообразие микросателлитных локусов позволяет определить процессы, происходящие в генетической структуре популяции (инбридинг, случайный дрейф генов и т. д.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК проводили солевым [1] и колоночным методами [2] из фрагментов плавниковой каймы, отобранных прижизненно, зафиксированных в 95%-ном этаноле и хранившихся при температуре 20 °С. Отбор ДНК-содержащих тканей производили во время проведения рыбоводных мероприятий в 2014, 2016 и 2019 гг. на предприятиях Азово-Черноморского (Темрюкский осетровый рыбоводный завод (ТОРЗ) и Гривенский осетровый рыбоводный завод (ГОРЗ)) и Азово-Донского (Донской осетровый завод (ДОЗ)) филиалов ФГБУ «Главрыбвод». В качестве группы сравнения были проанализированы пробы русского осетра, отобранные от особей из естественной популяции. Выделенную ДНК очищали на микроколонках набором для очистки ДНК из реакционных смесей (Био Силика, Россия) или посредством магнитных частиц «ГМО-Магно Сорб» (Синтол, Россия).

Микросателлитный анализ

Для проведения микросателлитного анализа использовали паттерн из пяти полиморфных локусов (Afug 41, Afug 51, An 20, AoxD 161, AoxD 165), разработанных ранее для других видов осетровых рыб [3–5]. Для проведения ПЦР (полимеразная цепная реакция) использовали стандартную реакционную смесь (2,5 x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ; «Синтол»). Меченые праймеры, используемые при постановке ПЦР, были модифицированы на 5'-конце красителем FAM, R6G или TAMRA. Режим амплификации, выполненной на амплификаторах PTC-220 «Engine Dyad Cycler» и CFX 96 (Biorad), включал: предварительную денатурацию при 95 °С — 10 мин; 35 циклов синтеза ПЦР-продуктов: плавление 95 °С — 20 с; отжиг праймеров (8 циклов режим touchdown 58 °С с шагом понижения температуры в 0,5 °С в последующие циклы до 54 °С) — 25 с; синтез ДНК 65 °С — 40 с; этап досинтеза 65 °С — 10 мин. Продукты амплификации были разделены с помощью капиллярного электрофореза на устройстве секвенирования ДНК «Нанофор-05» (Экспериментальный завод научного приборостроения РАН). Полученные первичные данные обрабатывали в программе «ДНК ФА» Версия: 5.0.1.6 (Институт Аналитического приборостроения).

Статистическая обработка

Генетическое разнообразие оценивали в разработанной нами программе, использующей базовые возможности программного обеспечения Excel. Проведен расчет следующих показателей: количество

аллелей на локус (набор аллелей), среднее число аллелей в локусе на особь, величины наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, процент рыб, имеющих генотипы «слабых гетерозигот» (например, АААВ) и полные гомозиготы (например, АААА). Следует отметить, что для русского осетра из-за высокой вариабельности микросателлитных маркеров и полиплоидной природы этих рыб не всегда достаточен подход, использующий только оценку ожидаемой гетерозиготности потомства. Именно поэтому был предложен показатель — доля «слабых гетерозиготных генотипов» (например, АААВ) в потомстве, т. к. накопление «слабых гетерозигот», особенно в стаде производителей, повышает частоту гомозигот в следующем поколении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые локусы показали достаточно высокий полиморфизм (табл. 1), причем наибольшее количество аллелей было обнаружено в локусе Afug 51, где оно варьировало от 12 (у рыб ДОЗ) до 17 (у рыб ГОРЗ), а наименьшее — в локусе An 20 с уровнем варьирования от 7 (у рыб ТОРЗ) до 9 (у рыб ДОЗ). Разброс показаний среднего числа аллелей на особь составлял 2,2–3,4, но в целом у производителей из РМС рыбоводных заводов в течение всего периода исследований по каждому отдельному локусу наблюдалась сходная картина. Всего в исследованной выборке производителей из РМС по всем локусам было выявлено свыше 70 аллелей, причем максимальное количество аллелей (78) было отмечено у рыб на Донском осетровом заводе, минимальное (59) — на Темрюкском осетровом рыбоводном заводе. В большинстве случаев в исследованной выборке у производителей русского осетра по отдельным локусам наблюдали некоторый дефицит гетерозигот.

Таблица 1. Генетическое разнообразие производителей русского осетра из РМС

Локус	Год	N	L	M	H _o	H _e	АААВ, %	АААА, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Темрюкский ОРЗ								
Afug 41	2014	39	12	3,0	1,000	0,996	7,7	0
	2016	155	13	3,3	1,000	0,995	5,2	0
	2019	110	15	2,9	0,873	0,995	9,1	3,6
Afug 51	2014	39	11	2,3	0,846	0,995	15,4	23,1
	2016	154	17	2,2	0,838	0,997	26,0	16,2
	2019	110	14	2,2	0,800	0,997	21,8	11,8
An 20	2014	39	8	2,8	0,974	0,953	2,6	20,5
	2016	156	11	2,9	0,987	0,971	10,3	1,3
	2019	111	7	2,7	0,910	0,969	18,9	0,9
AoxD 161	2014	39	10	3,2	1,000	0,997	5,1	0
	2016	156	12	3,2	1,000	0,990	2,6	0
	2019	101	11	3,5	1,000	0,994	2,0	0
AoxD 165	2014	39	9	3,2	0,974	0,975	0	18,0
	2016	156	15	3,3	0,987	0,985	12,8	1,3
	2019	102	12	3,3	1,000	0,987	13,7	0
Гривенский ОРЗ								
Afug 41	2014	40	15	3,3	1,000	0,998	2,5	0
	2016	87	16	3,3	0,989	0,997	2,3	0
	2019	26	14	3,4	1,000	0,998	0	0
Afug 51	2014	40	16	2,1	0,825	0,995	17,5	25,0
	2016	87	19	2,2	0,862	0,997	25,0	14,3
	2019	26	17	2,3	0,923	0,999	30,8	7,7
An 20	2014	40	10	2,7	0,950	0,986	5,0	15,0
	2016	87	10	2,8	0,977	0,983	20,7	2,3

Таблица 1 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
An 20	2019	26	8	2,7	0,923	0,983	15,4	7,7
AoxD161	2014	40	12	3,2	1,000	0,994	7,5	0
	2016	87	12	3,3	1,000	0,992	4,6	0
	2019	26	11	3,4	1,000	0,992	7,7	0
AoxD 165	2014	40	12	2,7	0,900	0,925	12,5	35,0
	2016	87	14	2,7	0,920	0,952	31,0	8,0
	2019	26	14	2,8	0,923	0,927	34,6	7,7
ДОЗ								
Afug 41	2014	92	17	3,4	1,000	0,996	2,2	0
	2016	184	17	3,3	0,984	0,996	2,7	0
	2019	71	15	3,3	0,986	0,996	7,0	1,4
Afug 51	2014	93	14	2,4	0,892	0,995	10,8	23,7
	2016	256	20	2,3	0,832	0,997	23,8	15,6
	2019	70	12	2,3	0,886	0,981	25,7	11,4
An 20	2014	93	12	3,0	1,000	0,978	16,1	0
	2016	257	14	2,9	0,984	0,974	17,9	1,6
	2019	71	9	2,9	0,972	0,971	22,5	2,8
AoxD 161	2014	92	11	3,2	1,000	0,991	7,6	0
	2016	255	13	3,1	1,000	0,990	11,0	0
	2019	71	10	3,4	1,000	0,995	4,2	0
AoxD 165	2014	94	13	2,8	0,936	0,951	6,4	22,3
	2016	264	14	2,7	0,909	0,943	27,7	8,7
	2019	71	11	2,6	0,930	0,897	38,0	7,0

Примечание: N — кол-во особей в выборке; L — кол-во аллелей; M — среднее число аллелей на особь; H_o — наблюдаемая гетерозиготность; H_e — ожидаемая гетерозиготность; AAAB — доля слабогетерозиготных особей; AAAA — доля гомозиготных особей

Русский осетр — вид с пролонгированным периодом полового созревания. Исследования, проведенные в период 2014–2019 гг., позволили дать оценку показателей гетерозиготности производителей (поколение F_1) из РМС (табл. 2). При сравнении результатов, полученных от производителей на рыбоводных предприятиях, с данными рыб из естественной популяции наблюдается отсутствие дефицита гетерозигот в море. У производителей из РМС отмечается некоторое снижение наблюдаемой гетерозиготности, однако дефицит гетерозигот очевиден только у производителей русского осетра на Темрюкском ОРЗ, где он увеличился почти в три раза по сравнению с началом исследований, в то время как на остальных заводах у рыб выявлено даже небольшое снижение дефицита гетерозигот. Однако по всем без исключения заводам наблюдается другая, вызывающая опасения тенденция — почти двукратное увеличение у русского осетра доли слабо гетерозиготных особей, что в случае использования одних и тех же производителей может привести к увеличению в потомстве доли гомозиготных особей, что, в свою очередь, может не лучшим образом повлиять на адаптивную приспособленность вида. Это следует учитывать в производственном процессе, поскольку, как уже отмечалось, поддержание численности естественной популяции русского осетра в Азово-Черноморском бассейне в основном базируется на искусственном воспроизводстве. В целом можно отметить, что флуктуации между годами наблюдений находятся примерно на одном уровне. Достоверно значимого снижения генетического разнообразия не наблюдается.

Русский осетр относится к проходным видам, в биологии которых имеется два периода жизни: пресноводный и морской. В морском периоде жизни у русского осетра идет формирование и развитие репродуктивной системы, а у производителей из РМС этот процесс вынужден идти в пресной воде. Можно предположить, что в РМС у производителей русского осетра, выращенных на хозяйстве от «икры»,

Таблица 2. Изменение доли гетерозиготности в исследованной выборке производителей русского осетра, полученных из РМС и естественной популяции

Место отбора	Год отбора	H_o	H_e	D_h (%)	AAAA (%)	AAAB (%)
ТОРЗ	2014	0,959	0,983	2,4	12,3	6,2
	2016	0,962	0,988	2,6	3,76	11,38
	2019	0,917	0,988	7,1	3,26	13,1
ГОРЗ	2014	0,935	0,98	4,5	15	9
	2016	0,950	0,984	3,4	4,92	16,72
	2019	0,954	0,98	2,6	4,62	17,7
ДОЗ	2014	0,965	0,984	1,9	9,2	8,6
	2016	0,942	0,98	3,8	5,18	16,62
	2019	0,955	0,968	1,3	4,52	19,5
Естественная популяция	2010–2015	0,930	0,806	-5	7,04	23,01

Примечание: H_o — наблюдаемая гетерозиготность; H_e — ожидаемая гетерозиготность; D_h — дефицит гетерозигот; AAAA — доля гомозиготных особей; AAAB — доля слабогетерозиготных особей

идет генетическая перестройка, связанная с адаптацией организма к постоянной жизни в пресной воде т. е. формирование пресноводной формы данного вида.

На рис. 1–4 приведены графики распределения частот аллелей микросателлитных локусов рыб из РМС в сравнении с «дикими» рыбами, выловленными в естественных водоемах.

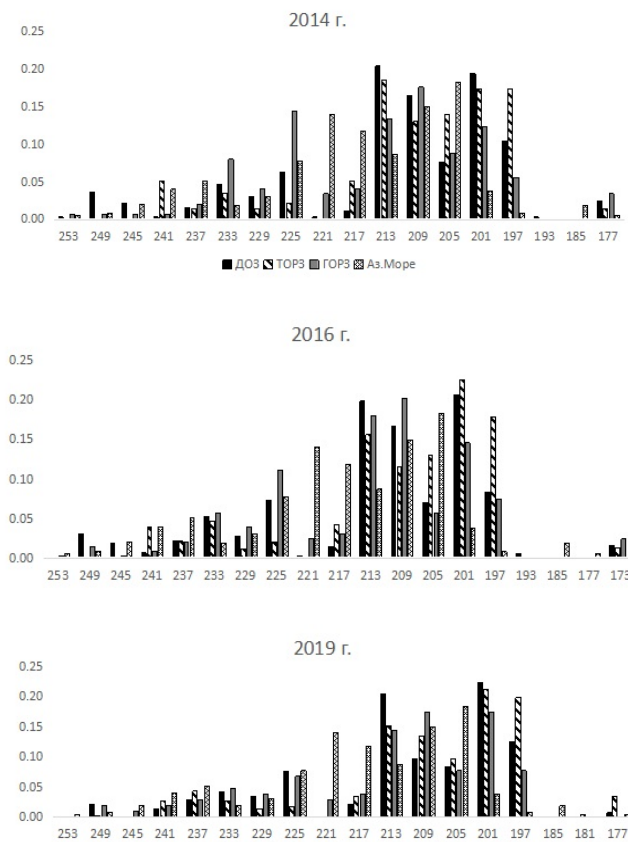


Рис. 1. Распределение аллельных частот по микросателлитному локусу Afug 41 у рыб из РМС и «диких» из моря; ось абсцисс — размер аллелей, пн; ось ординат — распределение аллельных частот

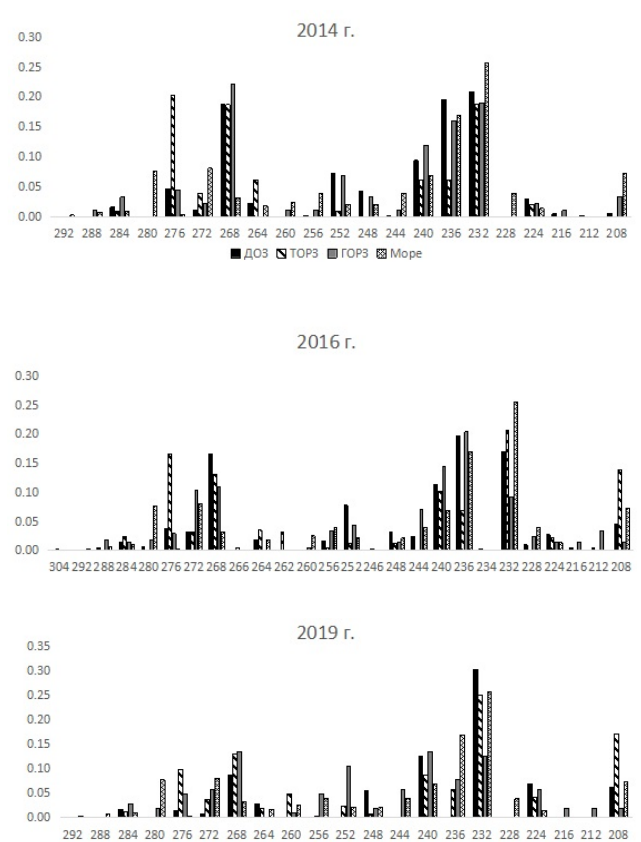


Рис. 2. Распределение аллельных частот по микросателлитному локусу Afug 51 у рыб из РМС и «диких» из моря; ось абсцисс — размер аллелей, пн; ось ординат — распределение аллельных частот

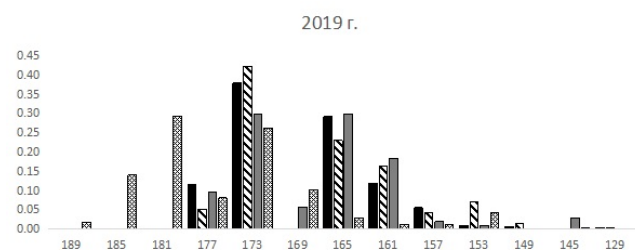
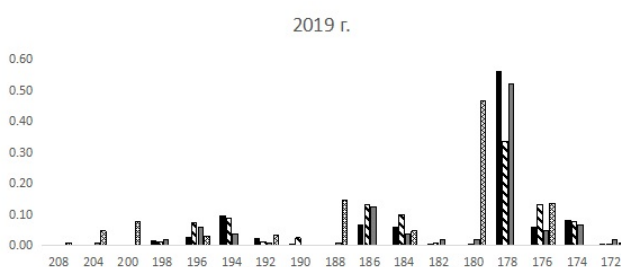
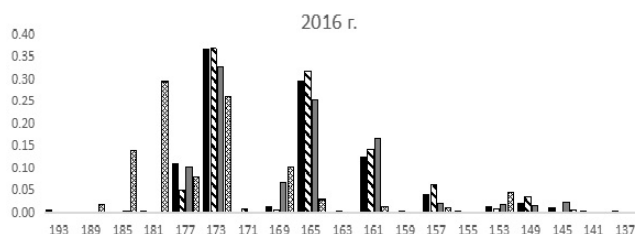
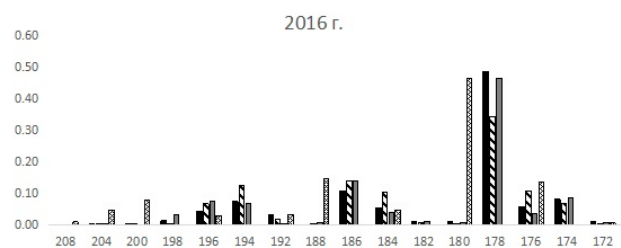
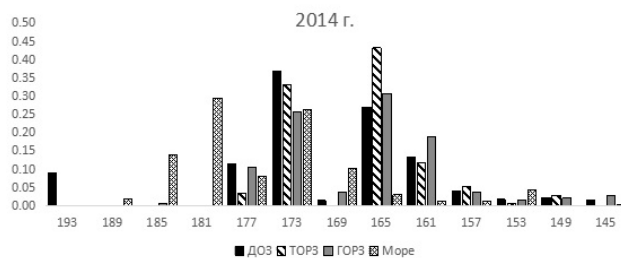
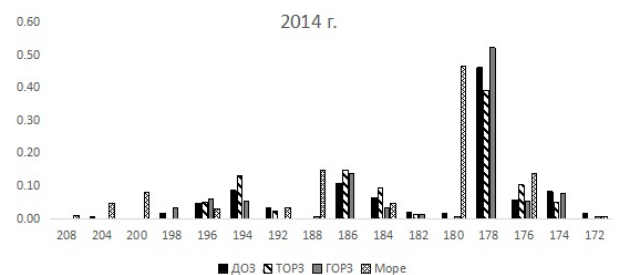


Рис. 3. Распределение аллельных частот по микросателлитному локусу AoxD 165 у рыб из РМС и «диких» из моря; ось абсцисс — размер аллелей, пн; ось ординат — распределение аллельных частот

Рис. 4. Распределение аллельных частот по микросателлитному локусу An 20 у рыб из РМС и «диких» из моря; ось абсцисс — размер аллелей, пн; ось ординат — распределение аллельных частот

Характер распределения частот аллелей в локусах Afug 41 и Afug 51 у производителей на ОРЗ в целом повторяет таковой у рыб дикой популяции. Однако наблюдается тенденция смены набора мажорных аллелей. Так, в локусе Afug 41 в дикой популяции это были аллели размером 205, 217 и 221 пн, а у рыб из РМС — 197, 201, 209 и 213 пн (рис. 1). Отмечена также разница в изменении мажорности аллелей по локусу Afug 51: если у рыб дикой популяции это были аллели 232 и 236 пн, то у производителей из РМС в разные годы отмечаются повышения частоты встречаемости таких аллелей, как 208, 268 и 276 пн (рис. 2).

Характер распределения частот аллелей по локусам An 20 и AoxD 165 у производителей на ОРЗ несколько смещен относительно рыб дикой популяции. Так, для локуса An 20 это смещение идет в сторону наименьших локусов на 8 пн, а для AoxD 165 — на 2 пн (рис. 3, 4).

Обращает внимание отсутствие у производителей ряда редких аллелей по всем представленным локусам: Afug 41 (185 пн); Afug 51 (292 пн); An 20 (181 пн, 189 пн); AoxD 165 (208 пн).

В трех исследуемых выборках производителей русского осетра, содержащихся в РМС, отмечено 19 частных аллелей, 8 из которых приходится на локус An 20.

Исчезновение и появление редких аллелей (частота встречаемости <5 %) как по краям, так и внутри распределений не имеет какой-либо направленности, а обусловлено генетическим дрейфом (случайными событиями) в выборках с малой эффективной численностью.

ВЫВОДЫ

В настоящее время работа на рыболовных предприятиях нацелена исключительно на выполнение количественных показателей плана по выпуску молоди русского осетра в бассейн Азовского моря. Подобный подход не вполне пригоден для долгосрочного успеха в программе сохранения и восстанов-

ления вида в природной среде, так как осуществляется без учета генетического разнообразия выпускаемой молоди. В проведенном исследовании рыб первого поколения наблюдаются изменения, которые, возможно, являются следствием спонтанно сформированного по принципу доступности из весьма ограниченного числа производителей РМС. Отмечается сокращение генетического разнообразия за счет элиминации редких аллелей и появления новых. Проведенная работа, несомненно, должна быть продолжена, т. к. выявленные даже за такой короткий срок направления изменения генетического разнообразия восполняющей популяции требуют определенной корректировки производственного процесса на рыбоводных предприятиях. В программе сохранения и реституции исчезающего вида с помощью искусственного воспроизводства на рыбоводных предприятиях необходимо учитывать генетический профиль производителей для оптимизации схем скрещивания с целью поддержания высокой генетической variability получаемого потомства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aljanabi Salah M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, no. 22. Pp. 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
2. Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Mol. Ecology Notes.* 2006. Vol. 6. Pp. 998–1002. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x.
3. Zane L., Patarnello T., Ludwig et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. Vol. 2. Pp. 586–588. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00328.x.
4. Henderson-Arzahola A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. Vol. 2. Pp. 437–439.
5. Welsh A., May B. Development and standartization of disomic microsatellite markers for lake sturgeon genetic studies // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. Vol. 22. Pp. 337–344.