

Использование маркера мтДНК для оценки влияния интродукции на генетическую структуру азовской популяции русского осетра

Н.Н. Тимошкина, Е.Т. Рынза

Русский осетр (*Acipenser gueldenstaedti*) - анадромный вид древней и уникальной группы хрящевых ганоидов, занимавший до недавнего времени обширный ареал в Каспийском и Азово-Черноморском бассейнах. Перелов и браконьерство, связанные с высоким спросом и ценой на чёрную икру и осетрину, а также потеря нерестовых территорий из-за строительства гидротехнических сооружений привели к падению численности вида (Реков, 2000). Последние полвека восполнение популяции русского осетра в Азовском море обеспечивается более чем на 95 % за счет искусственного воспроизводства на осетровых рыбодобывочных заводах (ОРЗ). В рамках организации работы донских и кубанских ОРЗ, для решения возникавших производственных задач была введена практика завоза оплодотворенной икры русского осетра каспийского происхождения. Проведение оценки эффективности интродукции и её влияния на структуру азовской популяции не было успешным из-за сложности внутривидовой идентификации особей как по морфологическим (Подушка, 2003), так и биохимическим (Субботкин, 1987) признакам. Следует отметить, что морфометрический анализ и разделение белков характеризуют популяции русского осетра несколько различными, но в целом перекрывающимися спектрами значений.

Первоначально в целях идентификации осетровых рыб и коммерческих продуктов из них были предложены и сегодня широко используются методы ДНК-идентификации, в частности на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК). Позднее в работах, посвященных филогенетическим отношениям в Понто-Каспийской группе осетров, у 30-32 % (Doukakis et al., 2005) особей русского осетра из Каспийского моря был выявлен так называемый "baerii-like" (BL) митотип. Уникальность данного митотипа заключается в его высокой гомологии с мтДНК сибирского осетра (*A.baerii*). Эти данные легли в основу методики видовой идентификации русского осетра с типичным GUE митотипом и BL митотипом (Мюге и др., 2008).

Целью нашей работы была, во-первых, идентификация BL-митотипа в популяции русского осетра Азово-Черноморского бассейна и, во-вторых, - оценка динамики численности BL-особей как показателя эффективности интродукции русского осетра из Каспийского моря.

Материалы и методы

Материалом исследования служили половозрелые особи двух популяций (Азовского моря и Северо-западной части Черного моря) русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833, выловленные в 1999-2005 гг. В работе также использовали спилов жесткого луча грудного плавника из ихтиологических сборов АзНИИРХ, проводившихся в течение 1960-1971 гг., и молодь азовского и каспийского происхождения, отобранная на донских и кубанских ОРЗ в 2003 и 2004 гг.

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов плавников и спилов при помощи метода солевой экстракции (Alfanabi et al., 1999) с нашими модификациями для спилов. Образец спила экспонировали в 50мМ ЭДТА в течение 24 ч. при комнатной температуре. После чего пробу подсушивали, измельчали и помещали в лизирующий буфер с протеиназой К (0,05мг/мл). Лизис проводили в течение 18 ч при 56 °С в термостатирующем шейкере.

Маркеры митохондриальной ДНК - «baerii-like» (BL) и «русский» (GUE) митотипы определяли с помощью метода видовой идентификации осетровых рыб, предложенного в работе (Мюге и др., 2008). ДНК русского осетра в результате проведения мультиплексной реакции обнаруживала ПЦР-продукт размером 217 пн, идентифицирующий «baerii-like» митотип, или 420 пн - «русский» митотип. Результаты разделения специфических разноразмерных ПЦР-продуктов в агарозном геле представлены на рисунке 1.



Рис. 1. Электрофореграмма фракционирования ПЦР-продуктов в 2%-ном агарозном геле

Дорожка 1 - «baerii-like» митотип *A. gueldenstaedtii*, дорожки 2-9 - «baerii-like» митотип *A. baerii*, дорожки 11-17 - «русский» митотип *A. gueldenstaedtii*; дорожка 10 - набор маркеров молекулярной массы ДНК (от 100 до 1000 пн, Fermentas).

Результаты и обсуждения

В таблице 1 приведены данные по идентификации в исследованных выборках двух маркеров мтДНК: выше описанного BL-митотипа и видоспецифичного для русского осетра GUE-митотипа.

Таблица 1

Количество особей с митотипами «baerii-like» (BL) и видоспецифичным (GUE) в популяциях русского осетра

Популяции	Кол-во исследованных особей	Кол-во особей с видоспецифичным (GUE) митотипом		Кол-во особей с «baerii-like» (BL) митотипом	
		абсолютное	%	абсолютное	%
Азовская (генерации 1931-1956 гг.)	102	102	100.00	0	0.00
Азовская (генерация 1975 г.)	325	307	94.5	18	5.5
Азовская (современная, генерации 1980-2005 гг.)	759	745	98.12	14	1.88
Черноморская (генерации 1945-1970 гг.)	163	163	100.0	0	0.00
Черноморская (современная, генерации 1975-2000 гг.)	86	86	100.00	0	0.00

В черноморской популяции BL-митотип полностью отсутствует, как в выборке из ныне обитающих в Чёрном море особей, так и в полностью сменившихся поколениях 1945-1970 гг.

В азовской группе, представленной 102 особями поколений 1931-1956 гг., BL-маркер не обнаружен. Отдельно проанализирована группа половозрелых рыб поколения 1975 г., так как в этом году был зафиксирован наибольший объём интродукции русского осетра из Каспийского моря (33,4 %) за период с 1970 по 1983 гг. Частота BL-митотипа среди взрослых рыб поколения 1975 года составила 5,5 %, что соответствует 18,3 % особей каспийского происхождения.

В современной азовской популяции, состоящей из особей поколений 1970-2005 гг., из 759 рыб выявлено 14 BL-особей. На основании дальнейшего анализа по возрасту было выделено две группы. Частота встречаемости «baerii-like» митотипа в группе половозрелых особей

составила 1 %, для группы генераций 2003-2004 гг. - 14,6 %.

На рисунке 2 представлены результаты мониторинга молоди русского осетра каспийского происхождения, выпущенной в Азовский бассейн в 2003 г.



Рис. 2. Распределение BL-митотипа в выборках молоди русского осетра каспийского происхождения, выращенной на донских и кубанских ОРЗ в 2003 г.

При тестировании личинок, выращенных на ОРЗ нашего региона в 2003 г., были определены BL-особи, исключительно завезенные из Каспийского бассейна. Средняя частота маркера по всем выборкам (35,4 %) была близка к значению, определенному для дикой каспийской популяции (30-32 %).

В течение последних 18-20 тысяч лет популяции русского осетра в Азово-Черноморском бассейне были пространственно изолированы от каспийской группы. Межпопуляционный поток генов возобновился искусственно в прошлом веке, вследствие поставок оплодотворенной икры из Каспия на азовские осетровые заводы (рис.3).

Результаты исследования материалов из ихтиологических сборов АЗНИИРХа, характеризующих азовскую и западно-черноморскую популяции естественного нереста, показали отсутствие BL-митотипа, что позволяет сделать вывод о каспийском происхождении этого маркера.

Эффективность процесса интродукции в Азовском море молоди русского осетра каспийского происхождения до сих пор остается не выясненной с одной стороны из-за малого количества вселенной в 1970-1983-х гг. каспийской молоди относительно общего объема выпуска, с другой - из-за фенологического сходства между особями двух популяций. Однако для других видов осетровых (белуга и севрюга), каспийские и азовские популяции которых более дифференцированы по морфологии и полиморфизму белков крови, показана низкая выживаемость каспийской молоди и их миграция в Чёрное море на более взрослых стадиях жизни (Цветненко, 1984).

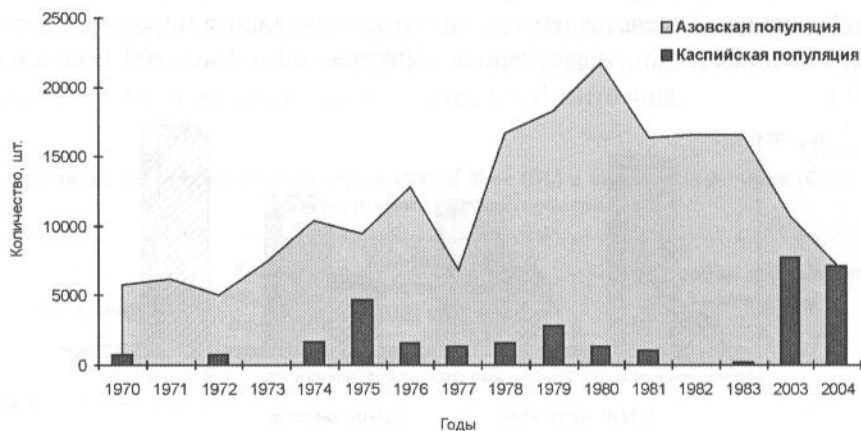


Рис. 3. Динамика выпуска в Азовское море молоди русского осетра различного происхождения

Мы предприняли попытку оценить эффективность интродукции особей каспийской популяции на примере поколения 1975 года. Расчеты, выполненные на основании данных статистики выпуска молоди и частоты VL-митотипа в этой генерации в половозрелом возрасте, показали, что доля особей каспийского происхождения уменьшилась за 12-15 лет в 1,8 раза. Оценка приближительна из-за отсутствия данных о начальной частоте VL-митотипа.

В 2003 и 2004 годах вновь был осуществлен завоз оплодотворенной икры русского осетра каспийского происхождения на рыболовные заводы Азовского бассейна. Мониторинг молоди на ОРЗ идентифицировал VL-особей только в выборке из каспийской популяции. Обнаруженная после этого частота встречаемости VL-особей в море (14,6 %) вполне согласуется с ожидаемой частотой маркера (15 %) в поколениях, содержащих около 50 % вселенных особей.

Дальнейшие мониторинговые исследования распределения «baerii-like» маркера в поколениях 2003-2004 гг. русского осетра дают уникальную возможность проследить эффективность интродукции.

Таким образом, с помощью метода, дифференцирующего “baerii-like” и типичный “gueldenstaedti” митотипы русского осетра, установлено, что данный маркер отсутствует в черноморской популяции, а его частота в современной азовской популяции этого вида составляет 1,9 %. Данная методика - удобный способ для идентификации происхождения особей в Азовском море.