

Популяционно-генетические характеристики пиленгаса, обитающего в Азовском море

А.В. Мирзоян, Е.А. Иванова, Н.Н. Тимошкина

В водоемах России имеется несколько видов рыб - акклиматизантов, ставших объектами отечественного рыбного хозяйства, и в их числе дальневосточная кефаль (*Mugil soiuu*). Акклиматизация дальневосточной кефали - пиленгаса в Азово-Черноморском бассейне завершилась в конце 80-х - начале 90-х годов XX столетия образованием самовоспроизводящейся популяции. При этом если для дальневосточного пиленгаса характерны невысокий темп роста, небольшие размеры и более позднее половое созревание, то в Азово-Черноморском регионе темпы роста и размеры пиленгаса значительно больше (Пряхин, 1996). Новые условия обитания оказались благоприятными для вида, благодаря чему он широко расселился по акватории Азовского и Черного морей, вышел в Мраморное и Средиземное моря став одним из важных объектов современного промысла в Азово-Черноморском бассейне.

В сложившейся ситуации, очевидно, что научно обоснованное управление и организация длительной эксплуатации живых природных ресурсов, в частности азовского стада пиленгаса, невозможно без достоверной информации о динамике генетической структуры популяций.

Цель данной работы заключалась в оценке популяционно-генетических характеристик пиленгаса, обитающего в Азовском море.

Материалы и методы

Образцы тканей от 50 особей пиленгаса отбирали весной 2007г, во время нерестовых миграций этого вида в Азовском море. Биологический материал от свеживывловленной рыбы (фрагмент хвостового плавника) закладывали в пробирки с фиксатором (спирт этиловый, высшей очистки).

Выделение ДНК из соматических тканей рыб осуществляли классическим фенол-хлороформным и перхлоратным методами. Качественный и количественный анализ выделенной ДНК оценивали методом электрофореза в 6%-ном агарозном геле (рис.1).

Для проведения RAPD-ПЦР пиленгаса использовали 11 праймеров ОРА 07, ОРА02, ОРА05, ОРА11, ОРА16, ОРЕ01, ОРЕ02, ОРЕ03, ОРЕ04, ОРЕ14, ОРЕ15, отобранных по базам данных, полученных из GenBank и литературных источников. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камерах

для вертикального электрофореза (Хеликон, Москва) и визуализировали путем окрашивания бромидом этидия и фотографирования в проходящем УФ-свете. RAPD-спектры ДНК исследуемых образцов исследовали с помощью программного обеспечения Phoretix 1D Advanced (Nonlinear Dynamics).

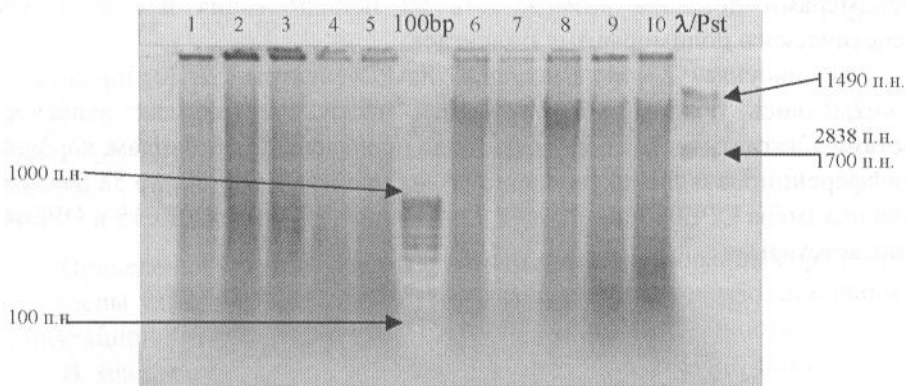


Рис. 1. Электрофореграмма тотальной ДНК пиленгаса

1-10 – ДНК пиленгаса; 100bp, λ Pst – маркеры молекулярной массы ДНК.

Полученные спектры переводили в бинарные матрицы. Статистическую обработку проводили по следующим показателям: количество нуль-аллелей по всем анализируемым бэндам, несмещенные частоты нуль-аллелей, дисперсия несмещенных частот, гетерозиготность всех нуль-аллелей, среднее гетерозиготности, ошибка средней гетерозиготности.

Результаты и их обсуждение

Изисследованных 11-типпраймеров только ОРА02(3'-AAGGGCGTGG-5'), ОРЕ03(3'-CACGTAGACC-5'), ОРЕ04(3'-CCGTACAGTG-5') и ОРЕ15(3'-ССААСFCGСА-5') давали четкие специфичные RAPD-паттерны. Остальные олигонуклеотиды демонстрировали мономорфность, или инициировали синтез небольшого количества фрагментов, либо слабых по интенсивности, либо сливающихся в «шмер» бэндов, что делает бессмысленным их применение для изучения генетического полиморфизма пиленгаса.

Для подобранных праймеров были оптимизированы условия RAPD-ПЦР, в частности, состав реакционной смеси, включающей 10 -ти кратный буфер -2,5 мкл, dNTP (2,5 мМ) - 1,0 мкл, MgCl₂ (2.5 мМ) - 1,0 мкл, праймер (5 о.е. в мл)- 0,5 мкл, HotTaq-полимераза (5 ед. в мкл) – 0,2 мкл, исследуемая ДНК (2 мкг/мл) -5,0 мкл. Для используемых праймеров

предложена следующая программа ПЦР на термоциклере:

Первичная денатурация: 1 цикл, 94 °С – 10 мин.

Далее 36 циклов: 94°С – 1 мин, 32 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин.

Досинтез: 1 цикл: 72 °С – 10 мин.

Проведенная RAPD-ПЦР ДНК особей пиленгаса с подобранными праймерами показала возможность их использования для изучения генетического полиморфизма пиленгаса.

На рисунке 2 представлены RAPD-спектры ДНК пиленгаса. Учитывались полосы(бэнды) средней части спектра, как наиболее четкие. Статистическая обработка была проведена по 66 бэндам, хорошо дифференцировавшимся на спектрах для праймера OPA02, по 58 бэндам для праймера OPE03 и по 31 и 46 бэндам для праймеров OPE15 и OPE04 соответственно.

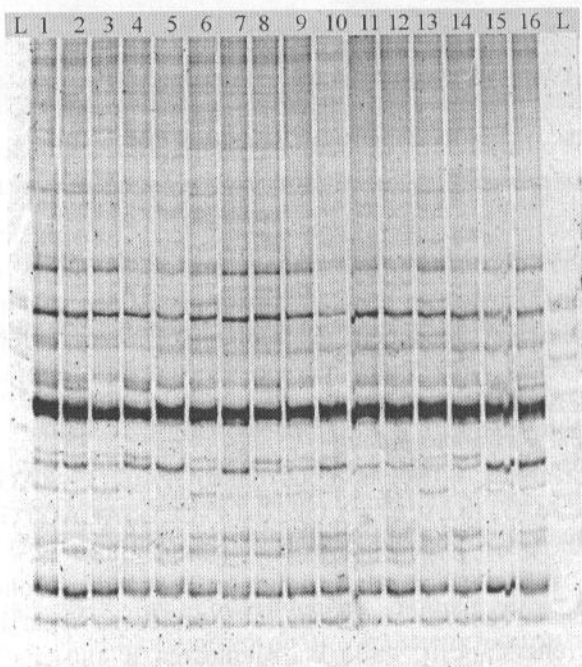


Рис. 2. Электрофореграммы RAPD-OPE15 пиленгаса

На крайних дорожках – маркеры молекулярной массы ДНК. Слабые по интенсивности полосы (бэнды) — < 2-5 % от максимальной интенсивности в пределах одного профиля ДНК - были исключены из анализа.

В таблице 2 приведены характеристики спектров полученных фингерпринтов пиленгаса с праймерами OPA02, OPE04, OPE03 и OPE15.

Характеристика RAPD-фингерпринтов пиленгаса

Праймер	Кол-во бэндов	Минимальное число бэндов на особь	Максимальное число бэндов на особь	Среднее число аллелей	Доля полиморфных аллелей	Размер выборки, N
OPA02	66	12	25	19.75 ± 1.93	0.939	40
OPE03	58	13	27	19.76 ± 1.94	0.862	42
OPE15	31	13	18	16.19 ± 1.23	0.742	39
OPE04	46	12	29	20.55 ± 1.68	0.913	42

Приведенные данные показывают, что для использованных праймеров получены удовлетворительные результаты по такому наиболее важному популяционно-генетическому показателю, как полиморфность.

В ходе математической обработки бинарных таблиц, построенных на основе RAPD-спектров, были рассчитаны средние значения гетерозиготности по использованным праймерам:

праймер OPA02 – 0.213 ± 0.134 ;

праймер OPE03 – 0.231 ± 0.107 ;

праймер OPE15 – 0.267 ± 0.130 ;

праймер OPE04 – 0.306 ± 0.122 .

Полученные значения достоверно не различаются между собой. Средняя гетерозиготность исследованной выборки пиленгаса составила 0.254 ± 0.123 , что попадает в интервал, характерный для этого показателя, определенного по RAPD для целого ряда неродственных видов, от сосен до москитов. Таким образом, получены данные по популяционно-генетическим характеристикам пиленгаса, обитающего в Азовском море, которые могут быть эффективно использованы в рациональной организации промысла и контроле динамики выявленного уровня генетического разнообразия.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что пиленгас в условиях Азовского моря вообще должен стать объектом всестороннего и пристального изучения относительно прогнозирования результатов изменений параметров популяций, так как даже немногие случаи успешной акклиматизации приводят к нежелательным экологическим изменениям и непредсказуемы в плане эволюционных последствий при изменении условий среды.