

## ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БЕЛУГИ (*HUSO HUSO*) АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА НА ОСНОВАНИИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГАПЛОТИПОВ

<sup>1,2</sup>Алимова А.Ш., <sup>1,3</sup>Воробьева А.В., <sup>1,3</sup>Гайдамаченко В.Н., <sup>1,3</sup>Головинов И.В.,  
<sup>1</sup>Небесихина Н.А., <sup>2</sup>Абросимова Е.Б.

<sup>1</sup> Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup> Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>3</sup> Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия

**Аннотация.** В статье представлено исследование генетического полиморфизма естественной популяции белуги Азово-Черноморского бассейна при помощи анализа контрольного региона митохондриальной ДНК (D-петли) методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции. В проведенном исследовании установлено, что две исследованные выборки популяций Черного и Азовского морей не имеют между собой значимой генетической дифференциации ( $P < 0,5$ ). Однако, общее генетическое разнообразие в естественной популяции Азово-Черноморского бассейна в период 2001-2010 годов находилось на сравнительно высоком уровне.

**Ключевые слова.** Популяция, полиморфизм, мтДНК, контрольный регион, гаплотип, белуга.

## CHARACTERIZATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF THE GREAT STURGEON (*HUSO HUSO*) IN THE AZOV-BLACK SEA BASYN BASED ON THE IDENTIFICATION OF MITOCHONDRIAL HAPLOTYPES

<sup>1,2</sup>Alimova A.Sh., <sup>1,3</sup>Vorobieva A.V., <sup>1,3</sup>Gaidamachenko V.N., <sup>1,3</sup>Golovinov I.V., <sup>1</sup>Nebesikhina N.A.,  
<sup>2</sup>Abrosimova E.B.

<sup>1</sup>Azov Fisheries Research Institute (AzNIIRKH), Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup> Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>3</sup>Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** The article presents a study of genetic polymorphism of the natural population of the great sturgeon of the Azov-Black Sea basin using the analysis of the control region of mitochondrial DNA (D-loop) by capillary electrophoresis with the detection of a fluorescence signal. In the study, it was found that the two studied samples of the populations of the Black and Azov Seas do not have significant genetic differentiation among themselves ( $P < 0.5$ ). However, the overall genetic diversity in the natural population of the Azov-Black Sea basin in the period 2001-2010 was at a relatively high level.

**Keywords.** Population, polymorphism, mtDNA, control region, haplotype, great sturgeon.

Белуга (*Huso huso* Linnaeus, 1758) – анадромный литофильный вид, относящийся к семейству осетровых. Ранний период развития проходит в реках, ювенильные особи затем мигрируют по течению в море. Нагуливаются в мелководных участках от 1,5 до 30 м (в зимний период до 130-180 м) в Азово-Черноморском бассейне (в северо-западной части), в последствии уходящим на нерест в пресные воды Дона, Кубани, Дуная.

Исторически Азово-Черноморский бассейн находился в числе лидирующих рыболовных районов по объемам вылова осетровых видов рыб, в том числе и белуги. Однако вследствие интенсивного гидротехнического зарегулирования крупных рек и нерациональной промысловой нагрузки, естественная популяция белуги начала катастрофически снижаться. На данный момент белуга включена в Красную книгу России и Приложение CITES.

Исследование генетической структуры естественной популяции белуги в настоящее время имеет широкое распространение и непосредственное значение как для разработки природоохранных, так и воспроизводственных мероприятий. В современный период поддержание Азово-Черноморской популяции белуги осуществляется исключительно за счет искусственного воспроизводства на рыбобreedных заводах, что является невозможным без учета генотипических особенностей естественной популяционной структуры.

Цель исследования заключалась в изучении нуклеотидной последовательности контрольного региона мтДНК (D-петли) естественной популяции белуги в Азово-Черноморском бассейне.

Материалом исследования служили 40 особей белуги, выловленные в бассейнах Азовского и Черного морей в период с 2001 по 2010 год. Отбор производился посредством прижизненного отрезания фрагмента хвостового плавника, после чего проба фиксировалась в 96-% спирте. Выделение суммарной геномной ДНК производилось при помощи набора реагентов «ДНК-ЭКСТРАН - 2». Первичная обработка данных проводилась на устройстве для секвенирования ДНК «НАНОФОР 05». Оценку внутрigrуппового генетического разнообразия и тест Таджimy на нейтральность проводили в программе «Mega v.5» и «DNAsp».

Длина последовательности контрольного региона мтДНК составила 614 п.н. В анализ были включены лишь особи женского пола и рекруты, поскольку передача митохондриальной ДНК осуществляется исключительно по материнской линии. Выявлено 18 митохондриальных гаплотипов, определяющихся полиморфизмом 42 позиций мтДНК, что составляет 6,84% от общего количества сайтов.

Количество синглетонных сайтов составило 28, парасимоничных или информативных филогенетически – 14. Нуклеотидный состав контрольного региона мтДНК характеризуется смещением в сторону аденина (частота нуклеотидов А=31,3%) и тимина (Т=26,6%) относительно цитозина (С=25,9%) и гуанина (G=16,1), что свойственно митохондриальному геному животных.

Две исследуемые группы особей Азовского и Черного морей характеризуются высоким гаплотическим разнообразием (H) (при  $P > 0,1$ ), что подчеркивает уникальность отдельных гаплотипов. Нуклеотидное разнообразие, напротив, оказалось относительно низким для каждой из выборок – 0,0126 и 0,0173 соответственно (таб.1).

Таблица 1 – Показатели генетического разнообразия белуги Азово-Черноморского бассейна.

<i>m</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>п</i>	<i>SD</i>	<i>D</i>
Азовское море					
5	23	1±0,016	0,0173	0,126	-0,56496
Черное море					
15	30	1±0,016	0,0126	0,024	-1,38478
Примечание: <i>m</i> - количество гаплотипов; <i>S</i> – количество полиморфных сайтов; <i>H</i> – гаплотическое разнообразие; <i>п</i> – нуклеотидное разнообразие; <i>SD</i> – стандартное отклонение; <i>D</i> – тест Таджimy на нейтральность					

Показатели теста Таджimy на нейтральность у двух выборок имели отрицательные значения (-0,56496 и -1,38478 соответственно), что отражает высокое число редких замен в сравнении с ожидаемым. Отрицательные значения теста Таджimy свидетельствуют о наличии направленного отбора в популяциях, сформированных под действием искусственного воспроизводства.

От общего количества выявленных гаплотипов 13 являются уникальными для Черного моря и лишь 3 для Азовского (HUS\_HAP13, HUS\_HAP14, HUS\_HAP15). Общими же для двух бассейнов оказались 2 гаплотипа - HUS\_HAP24 и HUS\_HAP30 (таб.2).

Таблица 2 – Распределение выявленных гаплотипов белуги в исследованных популяциях

№	Гаплотип	Популяция	Число особей	№	Гаплотип	Популяция	Число особей
1	HUS_HAP2	Черноморская	1	10	HUS_HAP28	Черноморская	2
2	HUS_HAP12	Черноморская	1	11	HUS_HAP29	Черноморская	1
3	HUS_HAP13	Азовская	2	12	HUS_HAP30	Азовская	4
						Черноморская	1
4	HUS_HAP14	Азовская	4	13	HUS_HAP31	Черноморская	4
5	HUS_HAP15	Азовская	2	14	HUS_HAP32	Черноморская	1
6	HUS_HAP19	Черноморская	1	15	HUS_HAP38	Черноморская	1
7	HUS_HAP22	Черноморская	2	16	HUS_HAP39	Черноморская	2
8	HUS_HAP23	Черноморская	4	17	HUS_HAP52	Черноморская	2
9	HUS_HAP24	Азовская	3	18	HUS_HAP54	Черноморская	2
		Черноморская	1				

В Азовском море было выявлено два мажорных гаплотипа - HUS\_HAP14 и HUS\_HAP30 с частотой встречаемости 26,6 %. В Черном море наиболее часто встречающимся оказался гаплотип HUS\_HAP23.

В целях уточнения наличия филогенетических отношений между исследуемыми популяциями была построена дендрограмма с использованием метода ближайшего соседа (Bootstrapped Neighbour-Joining Tree) с бутстрап-поддержкой (рис. 1)

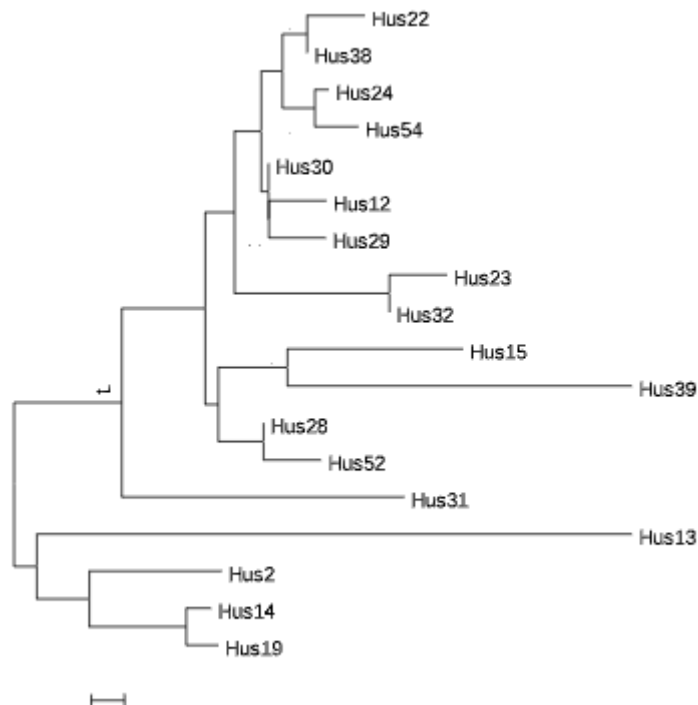


Рисунок 1 - Дендрограмма гаплотипов белуги

Степень генетической дифференциации популяций белуги оценивалась при помощи показателя попарных различий популяций  $F_{st}$ . Ключевое значение  $F_{st} < 0,05$  свидетельствует о незначительной межпопуляционной генетической дифференциации. Наиболее статистически значимыми среди 18 выделенных гаплотипов оказались HUS\_HAP13, HUS\_HAP31 и HUS\_HAP39.

Согласно проведенному исследованию митохондриальных гаплотипов, можно сделать вывод о статистически незначимой генетической дифференциации между азовской и черноморской популяциями белуги. Однако, стоит отметить, что общий уровень генетического разнообразия естественной популяции в 2001-2010 годах находился на сравнительно высоком уровне. Полученные результаты исследования целесообразно применять для рационального формирования ремонтно-маточных стад на осетровых заводах, тем самым поддерживая природное генетическое разнообразие.

#### Список использованных источников

1. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н.С. Мюге [и др.] // Генетика. - 2008. - Т. 44, №7. - С. 913-919.
2. Тимошкина Н.Н. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (Acipenseriformes) / Н.Н. Тимошкина [и др.] // Экологическая генетика. - 2010. - Т.8, №1. - С. 12-24.