

## ДОСЛІДЖЕННЯ мтДНК РОСІЙСЬКОГО ОСЕТРА (*Acipenser güeldenstäedtii*)

І.С. Рєзнікова-Галашевич<sup>1</sup>, А.В. Шельов<sup>1</sup>, В.Г. Спиридонов<sup>1</sup>,  
П.П. Табака<sup>1</sup>, С.Д. Мельничук<sup>1</sup>, А.І. Андрющенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК

<sup>2</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України

*Досліджено популяцію російського осетра (Acipenser güeldenstäedtii) за мтДНК-маркерами. Аналіз ділянки гена Сут b у межах вивченої вибірки виявив 7 гаплотипів, що відрізняються однонуклеотидними замінами.*

Осетрові риби (родина *Acipenseridae*), до складу яких належить російський осетер як об'єкт дослідження, відомі як реліктова група (існують понад 200 млн років), до недавнього часу були поширені лише в Північній півкулі. Висока комерційна цінність, яка стимулює інтенсивність вилову, і втрата частини ареалу внаслідок будівництва гідротехнічних споруд, що перешкоджають проході статевозрілих особин до місць нересту у верхів'я річок, призвели до різкого зниження їх чисельності. За даними IUCN (Міжнародний союз охорони природи), 24 види цієї родини мають статус рідкісних, а деякі з них перебувають на межі зникнення. Загрозливий стан природних популяцій осетрових риб став підставою для включення їх до Програми CITES — організації, яка регламентує міжнародну торгівлю рідкісними видами флори і фауни [1].

*Acipenseridae* характеризуються високою екологічною пластичністю та морфологічною мінливістю. Історично класифікація осетрових риб базується на мінливості морфологічних ознак, із різноманіття яких найчастіше використовують меристичні, адже вони зазнають найменших змін в онтогенезі риб. Зазначимо, що варіація фенотипу під впливом факторів зовнішнього середовища (модифікаційна мінливість) часто ставить під сумнів результати популяційних досліджень, які ґрунтуються на морфологічних відмінностях. Для філогенетичних і таксономічних досліджень, а також з метою збереження та відновлення запасів осетрових риб на додаток до морфології

все частіше застосовують молекулярно-генетичні методи [2].

Російський осетер — анадромний вид, що належить до древньої групи хрящових ганоїдів, має високу комерційну цінність. Ще до недавнього часу був широко розповсюджений у внутрішніх морях Євразії, проте на сьогодні через надмірний вилов та руйнування місць існування вид набув статусу рідкісного. Збереження популяції російського осетра та підтримка її оптимальної чисельності передбачає відновлення генетичного різноманіття з урахуванням структури популяції виду [3].

Раніше проведені дослідження виявили у російського осетра широку варіабельність морфологічних ознак, високий рівень поліморфізму білків крові та мітохондріальної ДНК. При цьому, ґрунтуючись на поведінкових, екологічних та меристичних ознаках, деякі автори поділяють вид на 3–4 географічно ізольовані підвиди з кількома нерестовим популяціями в кожному, інші виділяють тільки популяції. Крім того, відсутність чітких фенів, специфічних для внутрішньовидових груп, вимагають великих розмірів вибірки для ідентифікації окремих особин [3].

З метою оптимізації та апробації методики визначення видової належності продукції рибництва (м'ясо, ікра) проведено дослідження ділянок мтДНК 20 особин російського осетра, вилонених на контрольно-спостережувальних пунктах Азовського та Чорного морів у 2009 р.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі представлено результати аналізу нуклеотидних послідовностей

мтДНК російського осетра. Фрагменти грудних плавців відбирали у польових умовах у пробірки типу “Eppendorf”. Тотальну ДНК виділяли з використанням стандартного методу за допомогою набору “ДНК-сорб Б”.

Для дослідження мітохондріальної ДНК відібрано 9 пар праймерів [4], які є найбільш інформативними для проведення популяційних досліджень генетичної структури риб, що належать до родини осетрових (табл. 1).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за таких умов: денатурація — 2 хв за 95°C, відпал — 35 циклів 20 с за 92°C, 30 с за 52°C, 30 с за 72°C, елонгація — 10 хв за 72°C. Після закінчення реакції пробірки охолоджували до +4°C. Отримані ПЛР-продукти візуалізували за допомогою методу гель-електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, який містив бромистий етидій.

Полімеразну ланцюгову реакцію для типування ділянки гена *Cyt b* проводили за наступних умов: денатурація — 2 хв за 95°C, відпал — 35 циклів 20 с за 92°C, 30 с за 56°C, 30 с за 72°C, елонгація — 10 хв за 72°C. Після закінчення реакції пробірки охолоджували до +4°C.

Визначення нуклеотидної послідовності (сиквенування) проводили за допомогою генетичного аналізатора ABI Prism “3130 Genetic Analyzer” із набором реагентів “BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit”.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ампліфікація мтДНК з наступною візуалізацією продуктів ампліфікації за допомогою метода детекції в агарозному гелі показала, що в усіх досліджуваних особин наявні лише фрагменти мтДНК, що обмежуються праймерами AGF-ANR (рис. 1), які є специфічними для російського осетра. Розмір ПЛР-продуктів відповідав фрагменту ДНК розміром 410 п.н., що також є специфічним для представників виду *Acipenser güeldenstäedtii*. Як позитивний контроль прийнято фрагменти мтДНК стерляді, які обмежуються праймерами RutF-ANR.

Таким чином, підтверджено достовірність та високу видову специфічність запропонованої системи видової ідентифікації об'єктів рибицтва.

Нуклеотидна послідовність мтДНК хребетних організмів є гіперваріабельною. Мінливість первинної структури виявляється завдяки присутності поодиноких нуклеотидних замінів (транзиції та трансверсії), делеціями та інсерціями моно- та олігонуклеотидів, а також наявністю тандемних повторів із однотипних та консервативних блоків нуклеотидів.

Наступним етапом досліджень видової належності досліджуваних особин було визначення нуклеотидної послідовності (сиквенування) ділянки мтДНК, яка відповідає гену *Cyt b*, котрий, за дослід-

Таблиця 1. Структура наборів для видової ідентифікації риб [4]

Набір праймерів	Вид риб	Мішень	Розмір ПЛР-продукта, п.н.
1	Російський осетер	НАДГ-дегідрогеназа	420
2	Російський (baerii-like) та сибірський осетри	НАДГ-дегідрогеназа	215
3	Сибірський осетер	Д-петля	182
4	Білуга	НАДГ-дегідрогеназа	374
5	Калуга	Цитохром Б	439
6	Шип	Цитохром Ц оксидаза	329
7	Стерлядь	НАДГ-дегідрогеназа	190
8	Севрюга	Цитохром Ц оксидаза	266
9	Амурський осетер	Цитохром Ц оксидаза	254

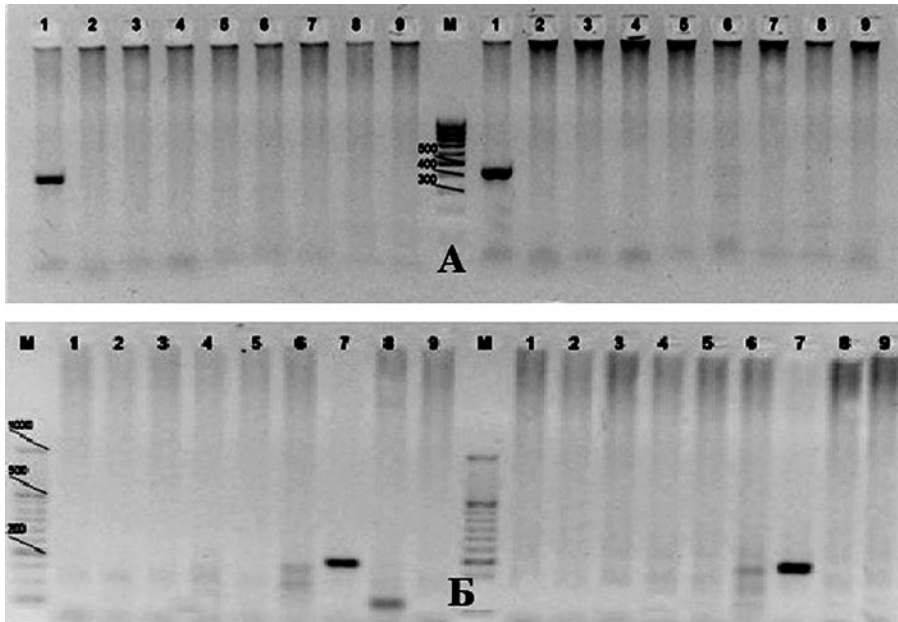


Рис. 1. Електрофорез ПЛР-продуктів ампліфікації зразків ДНК російського осетра з різними праймерами: М — маркер 100–1500 п.н., 1 — AGF-AHR; 2 — ABF-AHR; 3 — ABRM-ABF; 4 — HusF-AHR; 5 — DauF-AHR; 6 — NudF-AHR; 7 — RutF-AHR; 8 — SteF-AHR; 9 — SchF-AHR; А — зразки російського осетра, Б — зразки стерляді

женнями Мюге зі співавт. [4], а також Бірштейном зі співавт. [5, 6], має не лише видову, а й расову специфічність.

Визначення нуклеотидної послідовності ділянки гена *Cyt b* у 18 особин російського осетра показало, що довжина отриманих послідовностей коливається

в межах 692–739 п.н. Виявлені послідовності гаплотипів зводили до консенсусної послідовності відносно референсної послідовності та визначали варіабельні нуклеотидні позиції. У виявлених гаплотипах спостерігається від 2 до 5 нуклеотидних замін на одну послідовність (табл. 2).

Таблиця 2. Структура нуклеотидної послідовності гена *Cyt b* гаплотипів російського осетра

Зразок	Положення нуклеотидів у послідовності									Відносна частота гаплотипів	Номер у GenBank
	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	4	4	4	4	4	4	5	5	5		
	7	7	7	8	9	9	0	1	2		
	0	4	7	5	1	2	8	0	7		
	3	8	5	9	3	8	4	8	0		
Референсна послідовність GenBank: NC_012576	C	A	C	A	A	C	T	T	T		
2, 10, 15	T	G	•	•	•	T	A	C	•	0,167	AF238696
3, 4, 13, 18	T	•	•	•	G	T	A	C	•	0,222	JN698961*

Закінчення таблиці 2

Зразок	Положення нуклеотидів у послідовності									Відносна частота гаплотипів	Номер у GenBank
	T	•	•	•	•	•	A	C	•		
7, 9, 16, 17	T	•	•	•	•	•	A	C	•	0,222	AF238673
5	T	•	•	•	•	•	•	C	•	0,055	AF238678
14	T	•	T	•	•	T	A	C	•	0,055	AF238701
1, 6, 11, 12	T	•	•	G	•	•	A	C	C	0,222	AF238689
8	T	•	•	•	•	T	A	C	•	0,055	AF238688

Примітка. \* Нуклеотидні послідовності, які було депоновано у GenBank NCBI за результатами даних досліджень.

Нами було виявлено 9 варіабельних сайтів відносно референсної послідовності з мовчазними мутаціями. Аналіз генетичної структури досліджуваної популяції виявив наявність двох гаплотипів *Acipenser gueldenstaedtii*, представлених у GenBank NCBI (AF238673 та AF238701). Визначення нуклеотидної послідовності їх показало наявність варіабельних нуклеотидних позицій, представлених транзиціями 14703C/T, 14775C/T, 14928C/T, 15108T/C та трансверсією 15084T/A. Три гаплотипи відповідали підвиду *Acipenser gueldenstaedtii colchicus* (AF238696, AF238688 та — AF238689) з варіабельними нуклеотидними позиціями, представленими транзиціями 14703C/T, 14748A/G, 14775C/T, 14859A/G, 14913A/G, 14928C/T, 15108T/C, 15270T/C та трансверсією 15084T/A. Один з виявлених гаплотипів відповідав підвиду *Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii* (AF238678), нуклеотидна послідовність якого характеризувалась варіабельними позиціями транзицій 14703C/T та 15108T/C, а також трансверсією 15084T/A.

У результаті досліджень послідовностей мтДНК у 4 з виявлених гаплотипів визначено 5 варіабельних позицій, які можна вважати унікальними (14748A/G, 14775C/T, 14859A/G, 14913A/G та 15270T/C). Для перевірки цієї гіпотези за допомогою серверу NCBI здійснено аналіз відкритої рамки зчитування (ORF, Open Reading Frame) (рис. 2). Встановлено, що виявлені нами 9 поліморфних позицій

не є специфічними, тобто дані мутації є “мовчазними”, такими, що не призводять до змін у послідовності амінокислот і не впливають на фенотипічні ознаки осо-

```

1 atggcaaacatccggaaaacacaccctactctaaattattaat
M A N I R K T H P L L K I I N
46 ggagcatttattgacctccccacacctccaacatctccggtga
G A F I D L P T P S N I S V W
91 tgaaattttggctcacccttaggccttgccttgccacacaatc
W N F G S P L G L C L V T Q I
136 ctaacaggactatttctgcaatacctacacagctgacatttca
L T G L F L A M H Y T A D I S
181 acagccttctctctgttgcscacatctgscgagacgtaaatac
T A F S S V A H I C R D V N Y
226 ggatgactaatccgaaatattcatgcaaacggggcctctctctc
G W L I R N I H A N G A S F F
271 ttcatctgcttgctaccttcacgtagcacgaggtatatactatggt
F I C L L Y L H V A R G M Y Y G
316 tcatacctccaaaagaacactgaaatattcggagtaactcctctg
S Y L Q K E T W N I G V I L L
361 cttctaccataataaccctctctggtggatattgactgccctga
L L T M M T A F V G Y V L P W
406 ggacagatatttttggggggcaaccctcatcacaacctctc
G Q M S F W G A T V I T N L L
451 tccgcctttccgtacatcggcgacacactagtaaatgaatcga
S A F P Y I G D T L V Q W I W
496 ggcggcttttcagtagacaacgccaccttaccgatttttcgcc
G G F S V D N A T L T R F F A
541 ttccactttctctaccattctgtaactcggagctagcataatt
F H F L L P F V I A G A S M I
586 cacctctatttctacccaacaggatcaaaccaaccacagga
H L L F L H Q T G S N N P T G
631 ttaaacctcagacgacagattagggtacattccaccgctacttcta
L N S D A D K V T F H P Y F S
676 tataaagacctattgggggtttatcctaattcagctcggactcacc
Y K D L L G F L I L M L V G L T
721 tccgtagcactattcccccaacctctggggcgaccagacaac
S V A L F S P L N L L G D P D N
766 ttcacaccggcaacccccctgtcactccccacacataaagccc
F T P A N P L V T P P H I K P
811 gaatgatactttctctctcgctaccgcatctccgatccatccca
E W Y F L F A Y A I L R S I P
856 aataaacataggtggagttctagcccttcttctctctctagtc
N K L G G V L A L L F S I L V
901 ctaaatattagtaaccaatctcacaccttaaaccaacgaggaac
L M L V P M L H T S K Q R G N
946 acgtttccgaccctttcaaatctattctgagccctgggtggcc
T F R P L S Q I L F W A L V A
991 gacatactagctacatgaaattggaggcccaaccagttgaacac
D M L V L T W I G G Q P V E H
1036 ccgctctgcttaattggacaggtatctccacagtttatttggcc
P F V L I I G Q V A S T V Y F A
1081 ctattcctaactcggcctctctgactggcttaccagaaaataaa
L F L I A L P L T G L P E N K
1126 gcctcaaacgaaac 1140
A S N W N
    
```

Рис. 2. Відкрита рамка зчитування ділянки гена *Cyt b* мтДНК російського осетра

бин, але їх можна використовувати як генетичні маркери.

Також виявлено не зазначену в GenBank NCBI послідовність довжиною 683 п.н., кодовану 227 амінокислотами, яку було депоновано нами в GenBank (JN698961).

На основі отриманих даних побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків (рис. 3), на якій представлено виявлені нами 7 гаплотипів популяції російського осетра Азово-Чорноморського басейну.

У результаті зведення одержаних послідовностей до консенсусної визначено 7 варіабельних нуклеотидних позицій 113, 140, 224, 278, 293, 449 та 635 п.н (рис. 4). Очікувана гетерозиготність у цих позиціях перебувала на рівні 0,294, 0,111, 0,366, 0,366, 0,592, 0,111 та 0,366, відповідно, середня очікувана гетерозиготність за варіабельними позиціями становила 0,306.

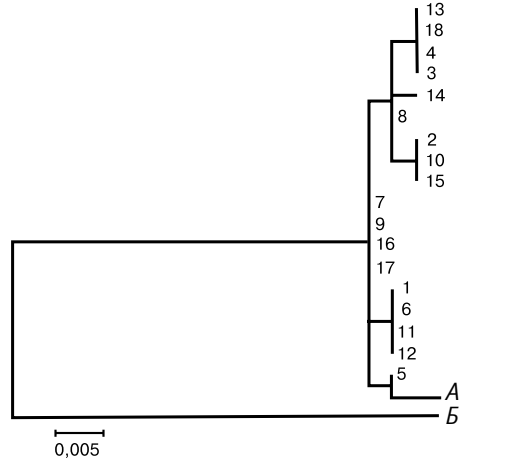


Рис. 3. Дендрограма філогенетичних зв'язків гаплотипів Азово-Чорноморської популяції російського осетра, побудована за допомогою алгоритму UPGMA: А — *Acipenser gueldenstaedtii* GenBank: NC\_012576; Б — *Acipenser ruthenus* GenBank: GU647225.1 — референтні послідовності ділянки *Cyt b*

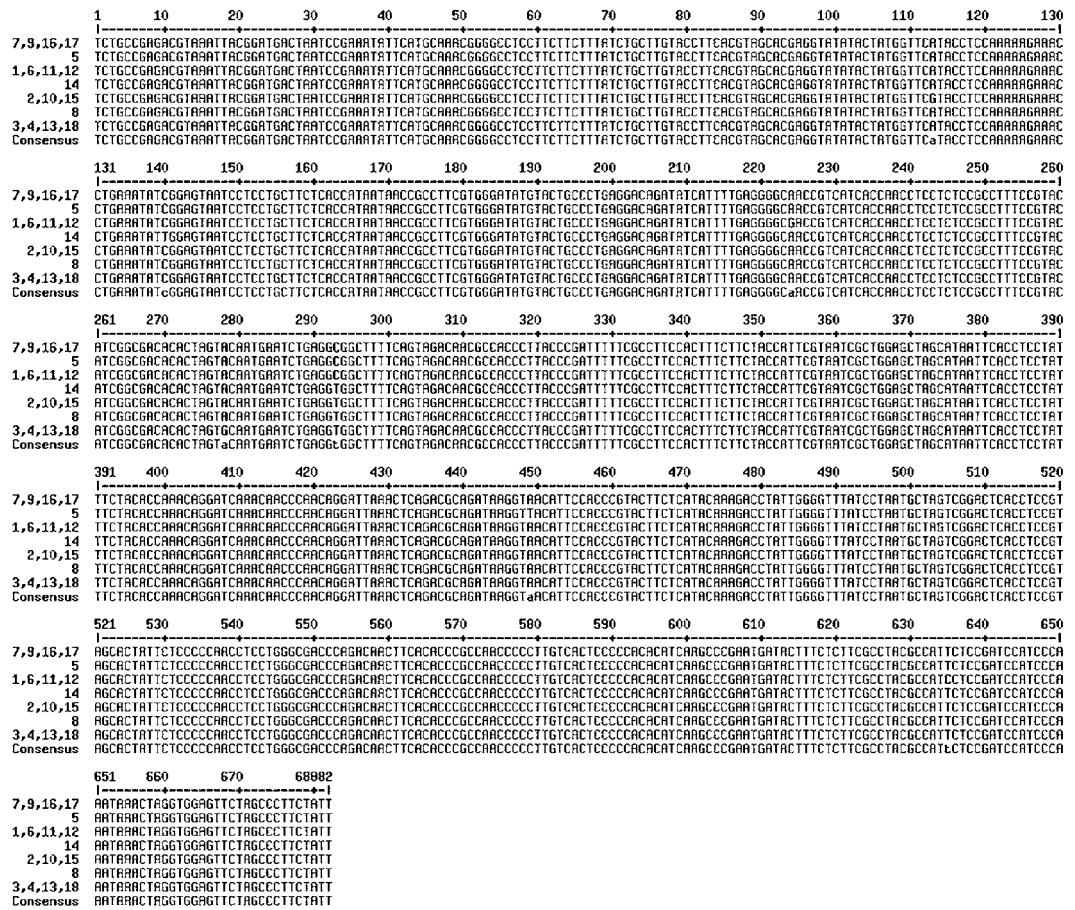


Рис. 4. Консенсусна послідовність гаплотипів російського осетра

Відповідно до проведених розрахунків генетичних дистанцій (табл. 3), між 7 гаплотипами російського осетра встановлено, що мтДНК-філогрупи демонструють високий рівень подібності одна до одної, а також однакову віддаленість одна від одної та від референсної послідовності.

Стосовно виявленого нами у досліджуваній популяції гаплотипу *Acipenser güeldenstäedtii güeldenstäedtii*, то, як відомо, російський осетер є ендеміком Понто-Каспійського басейну і належить до древньої реліктової групи риб, відомої з верхньоюрського періоду (понад 240 млн років тому). Історія розселення осетрових риб нерозривно пов'язана з геологічною історією системи великих євразійських басейнів. Наразі російський осетер існує в межах морів, що дуже відрізняються за екологічними характеристиками, а його внутрішньовидова диференціація пов'язана з еволюцією трьох морів. Є відомості щодо існування опрісненої водойми, розташованої в Азово-Чорноморському басейні, зв'язок якої з Середземним морем припинився в кінці плейстоцену внаслідок падіння рівня води (15–40 тис. років тому). Більше того, Азовське море у цей період зникало і перетворювалось на низинну долину, що перетиналась річкою Дон. Існуючий незначний час у кінці льодовикового періоду Кумо-Маничського водоскиду

російський осетер, можливо, здійснював незначні міграції з Каспійського моря до Чорного. Трансгресія Чорного моря, яка була зумовлена проривом середземноморських солоних вод через Босфор і поява внаслідок підйому рівня води Азовського моря дозволили сформуватись азовській популяції російського осетра з частини чорноморської популяції і закріпили ізоляцію популяції його у північно-західній частині Чорного моря і Азова. Отже, можна припустити, що чорноморська популяція походить від каспійської, а азовська в свою чергу — від чорноморської, що пояснює проміжне положення чорноморської популяції за отриманими даними мітохондріального та мікросателітного аналізу, це підтверджується присутністю в Азово-Чорноморській популяції двох рас російського осетра — азово-чорноморського (*Acipenser güeldenstäedtii colchicus*) та каспійського (*Acipenser güeldenstäedtii güeldenstäedtii*) [7].

Таким чином, історія розселення російського осетра та ізоляція його локальних популяцій унаслідок геологічних перетворень внутрішньоевразійських водойм позначилась на його генетичній структурі. Дослідження генетичної структури популяцій за використання маркерів мітохондріальної ДНК дає можливість визначати расову належність російського осетра.

Таблиця 3. Генетичні дистанції між нуклеотидними послідовностями між виявленими гаплотипами російського осетра

№ з/п	Гаплотип	1	2	3	4	5	6	7
1	7, 6, 16, 17							
2	1, 6, 11, 12	0,003						
3	3, 4, 13, 18	0,003	0,006					
4	2, 10, 15	0,003	0,006	0,003				
5	3, 4, 13, 18	0,003	0,006	0,003	0,003			
6	5	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004		
7	8	0,001	0,004	0,001	0,001	0,001	0,003	
8	Референсна послідовність GenBank: NC_012576	0,004	0,007	0,007	0,007	0,007	0,003	0,006

**ВИСНОВКИ**

Досліджено популяцію російського осетра Азово-Чорноморського басейну за мітохондріальними локусами мтДНК. Отримані дані дозволяють рекомендувати використання маркерів мтДНК для дослідження філогенетич-

них зв'язків у популяціях російського осетра. Даний напрям досліджень заслуговує на подальший розвиток, що дасть змогу отримати більш повну інформацію щодо генетичної структури рідкісних та зникаючих видів осетрових риб.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. *Raymakers C.* CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // *J. Applied Ichthyol.* — 2006. — Vol. 22. — P. 53–65.
2. *Vecsei P., Charette R., Hochleithner M.* Guide to the Identification of Sturgeon and Paddlefish Species Controlled under the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. — Ottawa: CITES, 2004. — P. 30–33.
3. *Тимошкина Н.Н.* Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // *Генетика популяций и эволюция.* — Т. 8. — № 1. — 2010. — С. 12–25.
4. *Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М., Мюге В.Н.* Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // *Генетика.* — 2008. — № 7. — С. 913–919.
5. *Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F.* The DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // *Cytometry.* — 1993. — V. 14. — P. 377–383.
6. *Birstein V.J., Hanner R., De Salle R.* Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // *Environmental Biology of Fishes.* — 1997. — V. 48. — P. 127–155.
7. *Свиточ А.А., Селиванова А.О.* Новейшая история трех морей // *Природа.* — 1999. — № 12. — С. 17–25.

**ИССЛЕДОВАНИЕ мтДНК РУССКОГО ОСЕТРА  
(*Acipenser güeldenstäedtii*)**

*И.С. Резникова-Галашевич, А.В. Шелев, В.Г. Спиридонов,  
П.П. Табака, С.Д. Мельничук, А.И. Андрищенко*

Исследована популяция русского осетра (*Acipenser güeldenstäedtii*) с помощью мтДНК-маркеров. Анализ участка гена *Cyt b* в пределах изученной выборки обнаружил 7 гаплотипов, различающихся между собой однонуклеотидными заменами.

**STUDIED A POPULATION OF RUSSIAN STURGEON  
(*Acipenser güeldenstäedtii*)**

*I. Reznikova-Galashkevich, A. Sheliov, V. Spyrydonov,  
P. Tabaka, S. Melnychuk, A. Andriushchenko*

Studied a population of Russian sturgeon (*Acipenser güeldenstäedtii*) using mtDNA markers. Analysis of the *Cyt b* gene region within the studied sample founded seven haplotype differing in single nucleotide substitutions.