

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БРАЖНИКОВСКИХ СЕЛЬДЕЙ *ALOSA BRASCHNIKOWI* (БОРОДИН, 1904) КАСПИЙСКОГО МОРЯ

С.Ш.Сулейманов^{1*}

¹Институт Зоологии НАНА, Баку, Азербайджан

POPULATION-GENETIC ANALYSIS OF THE BRASCHNIKOWI HERRING *ALOSA BRASCHNIKOWI* (BORODIN, 1904) OF THE CASPIAN SEA

S.Sh. Suleymanov (Institute of Zoology, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В данном исследовании методом RAPD–ПЦР впервые изучена генетическая изменчивость популяции бражниковских сельдей (*Alosa braschnikowi*: *A.b. braschnikowi*, *A.b. agrachanika*, *A.b. kisselewitschi*, и *A.b. sarensis*), распространенных в разных географических районах Каспийского моря. Результаты RAPD анализа и статистический анализ с помощью компьютерной программы UPGMA показали, что *A.b. braschnikowi*, *A.b. agrachanika* и *A.b. kisselewitschi* имеют общие черты по сравнению с саринской сельди (*Alosa braschnikowi sarensis*). Таким образом, данное исследование способствует получению знаний о морфологических и генетических вариациях в этих четырех подвидах каспийских сельдей и дает нам возможность указать, что вид саринская сельдь (*A. Sarensis*) является отдельным видом, принадлежащим к роду *Alosa*.

Abstract. The present study evaluated the patterns of genetic variation using RAPD-PCR techniques for the first time on four subspecies of Brajnikov herrings (*Alosa braschnikowi*: *A.b. braschnikowi*, *A.b. agrachanika*, *A.b. kisselewitschi*, and *A.b. sarensis* gathered from various arias of the Caspian Sea. The results of RAPD analysis and statistical analysis using UPGMA computer software revealed that *A.b. braschnikowi*, *A.b. agrachanika* and *A.b. kisselewitschi* have many similar characters compared to the *A.b. sarensis*. *A.b. sarensis* exhibited distinct variation in the morphological characters well as in RAPD-PCR analysis. Thus the present investigation contribute to the knowledge on morphological and genetic variation in these four subspecies of the Caspian herrings and gives us privilege to indicate that the species *A. sarensis* is a separate species belonging to the Genus *Alosa*.

Ключевые слова: бражниковские сельди, саринская сельдь, RAPD анализ, Каспийское море, ПЦР.

Keywords: brajnikov herrings, sari herring, RAPD analyze, Caspian sea, PCR

*Сулейман Сулейманов, к.б.н., доцент, Институт Зоологии НАНА, AZ1073, ул.А.Аббасова,1128 квартал,504 проезд, Баку, Азербайджан, e-mail: suleyman.s@mail.ru

Поступила в редакцию: 7 Марта 2017

1. Введение

Бражниковская сельдь - *Alosa braschnikowi* (Borodin, 1904) распространена только в Каспийском море и принадлежит роду *Alosa*, семейству *Clupeidae*, подотряду *Clupeoidei* и отряду *Clupeiformes*. Бражниковские сельди отличаются широкой экологической пластичностью и высокой скоростью морфологической эволюции. Происхождение и

эволюция их современных популяций тесно связаны с историей позднего четвертичного оледенения [2, 3].

Таксономия представляет собой новаторское исследование жизни на Земле, которое закладывает основу для филогенетического древа жизни [21]. Оно обеспечивает необходимую базу для экологии и науки сохранения окружающей среды и делает доступ к огромным и, все еще в значительной степени неисследованным биоразнообразиям для человечества [21]. Для ихтиотаксономических исследований морфометрические признаки, как правило, используются для распознавания многих видов рыб. Это соизмеримые признаки, которые являются полезными для разделения близких родов, видов, подвидов и даже групп популяции в них.

Развитие молекулярных методов привлекло большое внимание для изучения генетического разнообразия рыб. Достижения в области молекулярной биологии позволило увеличить наличие различных маркеров ДНК, которая стала эффективным инструментом в исследовании генетики консервации [6, 15]. Случайные амплификации полиморфной ДНК (RAPD) являются простым и ПЦР основанным методом, который позволил значительные улучшения в области генетического анализа разнообразия в последние десятилетия. При применении этого метода используются произвольные праймеры для амплификации дискретных областей генома [20]. RAPD маркеров были использованы для оценки генетического разнообразия в многочисленных организмах и популяциях рыб, принадлежащих к тому же семейству или роду [5, 10, 17].

2. Материалы и методы

Материалом для генетических исследований послужили особи следующих подвидов вида *Alosa braschnikowi* (Borodin, 1904) из Каспийского моря: *A.b. braschnikowi* (Borodin, 1904), *A.b. agrachanika* (Michailowskaja, 1941), *A.b. kisselewitschi* (Bulgakov, 1926), *A.b.sarensis* (Michailowskaja, 1941), собранные летом в 2011 г. Сбор материала и их морфологический анализ осуществлялись согласно общепринятой методике в ихтиологических исследованиях [1]. Собранные пробы для морфометрического анализа были фиксированы в 4%-ом растворе формалина и свежие образцы рыб были сохранены в 90% этаноле для выделения геномной ДНК из различных тканей рыб. Тотальная геномная ДНК была выделена из печени, мышечной ткани и из лучей спинного плавника. При этом использовали стандартную методику смеси раствора фенилхлороформа [19]. Количественное определение ДНК было проведено на УФ области спектрофотометра. Количество ДНК измерялось путем получения чтения поглощения при 260 нм. а чистота ДНК была проверена путем вычисления соотношения значений оптической плотности при 260 нм и 280 нм. После выделения, образцы ДНК были взяты и смешаны с 7 мкл раствором бромфенолового синего (буфер для загрузки образцов) и 15 мкл ДНК смешанного продукта был загружен в 1,5% агарозный гель (50 мл), содержащего этидиум бромид в концентрации 0,5 мкг/мл геля.

Электрофорез проводили в течение от 1 до 2 часов при 50 вольт. После электрофореза гель помещали в УФ - просвечивания и полосы были визуализированы и сфотографированы в системе гель документации. Для анализа ДНК с RAPD праймерами, выделенную геномную ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР - амплификации с праймерами приобретенными из Operon Technologies, США. Первоначально двадцать различных праймеров были испытаны при амплификации (таблица 1). Десять из этих праймеров производили амплификацию в 72 полосах на агарозном геле, а четыре из них, лучше амплифицирующие, были выбраны для дальнейших исследований. RAPD профили, созданные, каждым набором праймеров были проверены для наличия или отсутствия амплификации продукта, с использованием агарозного геля. Появление полосы на геле отмечалось цифрой 1, а ее отсутствие как 0. Проведен кластерный анализ и дендрограмма построена на основе расчета попарного генетического расстояния с помощью метода UPGMA и компьютерной программы на основе POPGENE (версия 1.32) по Nei [18] и Yeh и соавт [22].

3. Результаты и обсуждения

Бражниковская сельдь *Alosa braschnikowi* (Borodin, 1904) в Каспии является политипическим видом, включающим в себя ряд подвидов и рас. Всего в Каспийском море у бражниковских сельдей мы различаем четыре подвида: долгинскую *A.b.braschnikowi* (нерест в северо-восточном Каспии), саринскую *A.b.sarensis* (Michailowskaja, 1941) (нерест в юго-западном Каспии), аграханскую *A.b.agrachanika* (Michailowskaja, 1941) (нерест в северо-западном Каспии) и гасанкулинскую *A.b.kisselewitschi* (Bulgakov, 1926) (нерест в юго-восточном Каспии). Эти подвиды имеют репродуктивную пространственную изоляцию и достоверно различимы между собой по ряду морфологических признаков [4]. Следует подчеркнуть, что долгинская, аграханская и гасангулинская сельди являются аналогичными по морфологическим признакам, а саринская сельдь в морфологическом плане отличается по ряд признакам, такие как длина головы, наибольшая высота головы, ширина лба, диаметр глаза, наибольшая высота тела, антедорсальное расстояние и постдорсальное расстояние. В целях выяснения реального существования этого подвида нами для уточнения на уровне вида был проведен так же генетический анализ, данные которого представлены в изложенной работе.

Основные компоненты анализа показали, что три подвида - долгинская сельдь, аграханская сельдь и гасанкулинская сельдь больше похожи и близкие подвиды, чем саринская сельдь (рис.1). Аналогичную тенденцию показал также и кластерный анализ (рис.2). Однако, морфометрические результаты недостаточны для установления генетической структуры популяции, которая часто приводит к таксономической неопределенности [11, 14]. Поэтому, исследование было расширено и проанализировались внутривидовые генетические вариации.

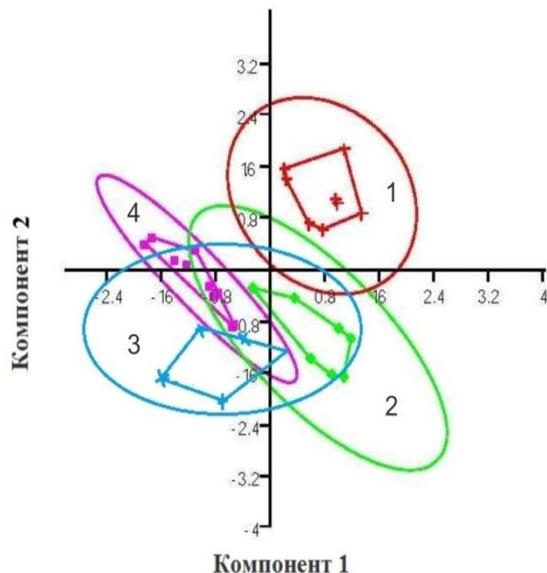


Рис. 1. Диаграмма разброса АОК, показывающая изменение четырех подвидов бражниковских сельдей: 1 – саринская сельдь; 2 - долгинская сельдь; 3 - гасанкулинская сельдь; 4 - аграханская сельдь

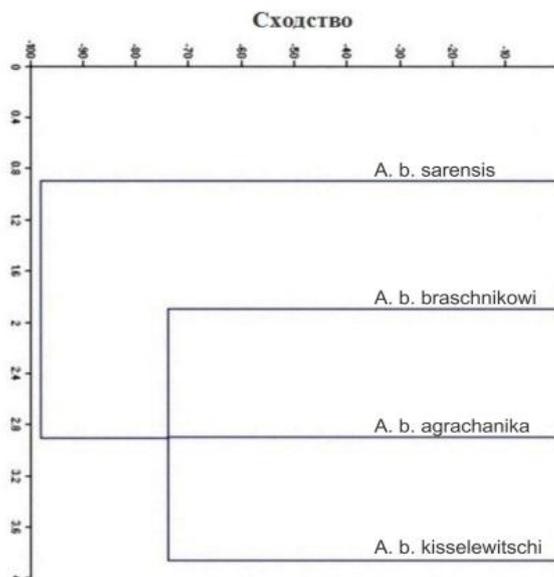


Рис 2. Кластерный анализ четырех подвидов бражниковских сельдей

Выделение ДНК высокого качества имеет важное значение для многих молекулярно-биологических исследований с использованием полимеразной цепной реакции [9]. Эта систематическая область методов предлагает новый набор признаков для анализа связей между различными таксонами рыб [8, 16]. В наших исследованиях оптимальное количество ДНК было обнаружено во всех экстрактах четырех подвидов рыб с использованными

различными праймерами. Из двадцати использованных праймеров, производимых Operon Technologies десять дали значительную полиморфную амплификацию. В общей сложности 72 надежных фрагментов были обнаружены с помощью 10 RAPD праймеров, молекулярной массой с 2600 до 3100. Таким образом, 4 из лучше амплифицированных, и показывающих на полиморфизм праймеров - ОРА-02, ОРА-03, ОРА-06 и ОРА -7 были использованы для дальнейшего исследования (таблица 1).

Таблица 1.

Нуклеотидная последовательность RAPD праймеров (ОРА-01-10) показывающая статус амплификации четырех подвидов сельдевых (самые эффективные праймеры выделены жирным шрифтом).

Код праймера	Секвенс праймера (5'to 3')	Молекулярная масса (Da)	Амплифи- кация	Полимор- физм
ОРА-01	CAGGCCCTTC	2985	ND	ND
ОРА-02	TGCCGAGCTG	3035	+	++
ОРА-03	AGTCAGCCAC	2987	+	++
ОРА-04	AATCGGGCTG	2964	ND	ND
ОРА-05	AGGGGTCTTG	3048	ND	ND
ОРА-06	GGTCCCTGAC	3056	+	++
ОРА-07	GAAACGGGTG	3108	+	++
ОРА-08	GTGACGTAGG	3012	ND	ND
ОРА-09	GGGTAACGCC	2978	ND	ND
ОРА-10	GTGATCGCAG	2992	ND	ND

Для убеждения однородности ДНК была проведена ПЦР амплификация с ДНК, выделенных из трех различных тканей: печени, мышечной ткани и лучей спинного плавника. У каждого подвида ПЦР анализ показал однородный результат для всех трех проб ДНК (рис. 3).

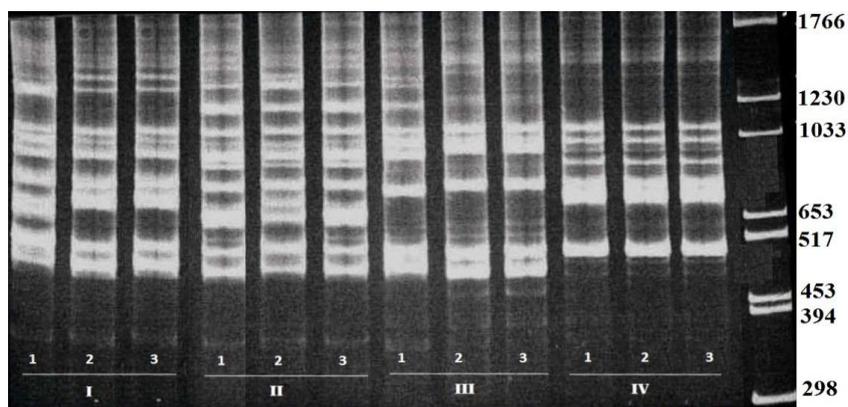


Рис. 3. Амплификация ДНК из различных тканей подвидов с ОРА-6 RAPD праймером: 1- ДНК из печени, 2 – ДНК из мышечной ткани и 3 – ДНК из лучей спинного плавника. I – долгинская сельдь, II – аграханская сельдь, III – гасанкулинская, сельдь и IV – саринская сельдь.

Исходя из этого, последующие генетические анализы с выбранными четырьмя праймерами были проведены только на ДНК, выделенными из мышечной ткани отдельных особей различных подвидов.

В анализах использованный каждый праймер производил различные полиморфные полосы у всех рыб (рис. 4).

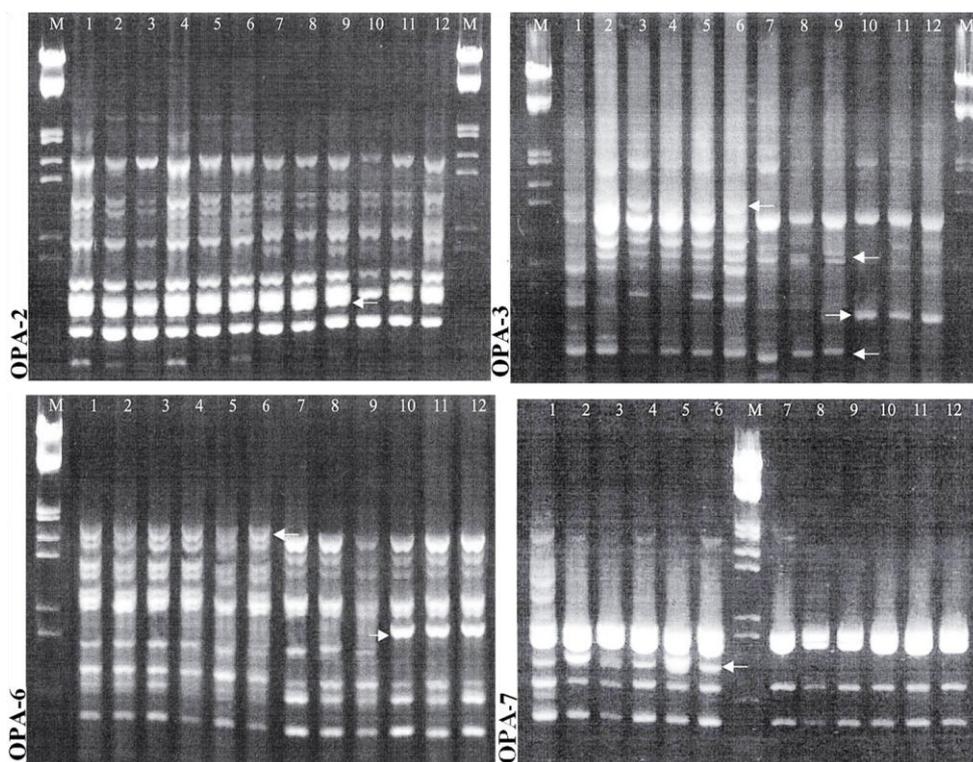


Рис. 4. Модель RAPD амплификации с различными праймерами проверены на четырех подвидах бражниковских сельдей. Три повтора для каждого подвида проведена на рисунке: полосы 1-3 - аграханская сельдь; 4-6 – гасанкулинская сельдь; 7-9 – долгинская сельдь; 10-12 - саринская сельдь. Стрелки указывают на специфические полосы маркеров для конкретного подвида; М – 1кпо маркеров.

Праймер OPA-6 производил в максимальном количестве амплифицированные продукты. Воспроизводимые полиморфные полосы от RAPD анализа были отобраны качественно на наличие или отсутствие в каждом образце. Общие RAPD фрагменты были найдены в долгинской, аграханской и гасангулинской сельдях с фиксированными частотами, которые наблюдались также во всех исследованных праймерах, подразумевая их генетическую близость. Парные сравнения генетического расстояния четырех подвидов показали, что долгинская, аграханская и гасанкулинская сельди больше похожи друг на друга с учетом морфологических индексов и с меньшим генетическим расстоянием (рис. 4), а саринская сельдь - высоким генетическим расстоянием с тремя вышеуказанными подвидами. Это указывает на удаленность этого подвида или же на уровне таксономического статуса отдельного вида - *Alosa sarensis*

(Michailowskaja, 1941). Аналогия наблюдается и в отношении кластерного анализа, в котором саринская сельдь была отделена от трех других подвидов исследованных сельдей (рис. 2). Таким образом, настоящие исследования показали степень таксономической - родственной связи между четырьмя подвидами бражниковских сельдей, которая будет в значительной степени способствовать изучению других видов рыб Каспийского моря.

Генетические подходы представляют мощные инструменты для изучения текущего состояния популяции, для понимания изменения численности популяции и ее сохранения [7]. RAPD метод является одним из наиболее часто используемых молекулярных методов для таксономических и систематических анализов различных организмов [13]. В настоящем исследовании определены морфометрические признаки и закономерности генетической изменчивости четырех подвидов сельдей. Морфологические и генетические анализы показали, что долгинская, аграханская и гасанкулинская сельди имели много схожих символов, в то время как, саринская сельдь проявляла различные вариации как отдельного вида - *Alosa sarenensis* (Michailowskaja, 1941) в роду *Alosa*.

Нынешняя структура генетического разнообразия является невидимым измерением биологического разнообразия, которая является результатом эволюционной истории развития подвидов и видов под воздействием естественного отбора в переменных условиях окружающей среды. Естественный отбор на местном уровне является эволюционной силой в отличие от потока генов. Сочетание этих двух сил создает мощный механизм для поддержания внутри видового разнообразия [12].

4. Выводы

Настоящее исследование показало, что четыре подвида бражниковских сельдей имеют явно отличимые морфометрические и генетические вариации. Результаты морфологического подхода показали, что долгинская сельдь, аграханская сельдь и гасанкулинская сельдь больше похожи друг на друга по сравнению с саринской сельди. Последняя демонстрирует определенную вариацию, как в морфологическом, так и генетическом плане. Данное исследование является вкладом в знание о морфологической и генетической изменчивости видов и подвидов бражниковских сельдей. Однако, более специфические и многомoleкулярные биомаркеры необходимы для понимания таксономической связи многих других видов и подвидов рыб, которые широко распространены в различных регионах Каспийского бассейна.

Благодарность

Автор статьи выражает благодарность д.б.н. К.Г. Гасымову, зав. лабораторию регуляторные системы клеток Института Ботаники НАНА, за оказанную помощь для молекулярно-генетических исследований.

Литература

1. Правдин И.Ф., (1966) Руководство по изучению рыб, Москва, Пищепромиздат, 376 с.
2. Световидов А.Н., (1943) О Каспийских и Черноморских сельдевых из рода *Caspialosa* и *Clupeonella* и об условиях их формообразования, *Зоол. журнал*, XXII(4), 222-233.
3. Смирнов А.Н., (1957) О происхождении и формообразовании бражниковских сельдей *Caspialosa braschnikowi* (Borodin.) Каспийского и Черного морей, *Тр. Карадагской биологической станции АН Укр. ССР*, 14, 92-121.
4. Сулейманов С.Ш., (2010) Ревизия бражниковских сельдей *Alosa braschnikowi* (Borodin, 1904) в азербайджанском секторе Южного Каспия, *Тр. Азерб. Общества Зоологов*, II, 655-660.
5. Ali B.A., Huang T.H., Qin Da. N., Wang X.M., (2004) A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research, *Rev. Fish Biol. Fish.*, 14, 443-453.
6. Avise J.C., (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, 532 p.
7. Belfiore N.M., Anderson S.L., (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review, *Mutat Res.*, 489(2-3), 97-122.
8. Carvalho G.R., Pitcher T.J., (1995) *Molecular genetics in fisheries*, Chapman and Hall, New York, 783 p.
9. Chakraborty S., Vijayan K., Nair C.V., Santra S.C., Bhattacharya T., (2008) Isolation and characterization of high quality DNA from marine benthic macroalgae, *J. Environ Biol.*, 29, 907-910.
10. Cooper M.L., (2000) Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) populations in Western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables, *Mil. Ecol.*, 9, 469-479.
11. Daniel R.J., (1997) Taxonomic uncertainties and conservation of the Western Ghats, *Curr. Sci.*, 73, 169-170.
12. Edward S., Buckler I.V., Jeffrey M., (2002) Molecular diversity and applications to genomics, *Cur. Opi. Pla. Bio.*, 5, 107-111.
13. Garg R.K., Sairkar P., Silawat N., Mehrotra N.N., (2009b) Genetic diversity between two populations of *Heteropneustes fossilis* (Blechn.) using RAPD profile, *Int. J. Zool. Res.*, 4, 171-177.
14. Garg R.K., Sairkar P., Silawat N., Vijay N., Batav N., Mehrotra N.N., (2009b) Genetic diversity between two populations of *Heteropneustes fossilis* (Blechn.) using RAPD profile, *Int. J. Zool. Res.*, 4, 171-177.
15. Haig S.M., (1998) Molecular Contributions to Conservation, *Ecology*, 79, 413-425.
16. Hills D.M., Morits C., (1996) *Molecular Systematic* Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, USA, 392 p.
17. Lockley A.K., Bardsley R.G., (2000) DNA-based methods for food authentication, *Trends Food Sci. Tech.*, 11, 67-77.

18. Nei M., (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, 89, 583-590.
19. Sambrook I., Russell D.W., (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Col Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3rd Ed, V.3, 2028 p.
20. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski I.J.A., Tingey S.V., (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
21. Wilson E.O., (2004) Taxonomy as a fundamental discipline, *Phil Trans Royal Soc., London B.*, 359:739.
22. Yeh F., Yang C. and Boyle T., (1999) POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton.