

УДК 595.384

Зоология**ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЛИННОПАЛЫХ РАКОВ *ASTACUS LEPTODACTYLUS* (ESCHSCHOLTZ, 1823) КАСПИЙСКОГО МОРЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ RAPD ТЕХНИКИ****А.П.Азизов**

(Представлено академиком НАН Азербайджана С.В.Алиевым)

Введение

Длиннопалый рак *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) входит в автохтонную фауну Понто – Каспийского бассейна, эволюция которого тесно связана с историей третичного внутреннего моря – Паратетиса, разбившимся на бассейны солоноватой и пресной воды в неогене, и оледенением, произошедшим в плейстоцене [5]. Центр видообразования европейских речных раков находился в Понто-Каспийском бассейне. Кроме того, семейство Astacidae, по-видимому, исторически сформировалось на данной территории, на что указывают и генетические исследования видов [8]. Несмотря на длительную историю исследований, систематика европейских, в том числе каспийских речных раков на сегодняшний день не является устоявшейся и находится в состоянии постоянного изменения на протяжении многих десятилетий. Только во второй половине двадцатого века было предпринято пять попыток таксономических ревизий европейских видов речных раков [9, 10]. Некоторые из них, без сомнения, являются комплексами видов, среди которых наиболее проблематичным до сих пор остается *Astacus leptodactylus*. Он является очень пластичным с морфологической, экологической, физиологической и эволюционной точек зрения видом [10, 14]. Представлены множество доказательств [6] для выделения понто-каспийских раков из рода *Astacus* в род *Pontastacus* в соответствии с Боттом [7]. Считается, что группа длиннопалых раков (*Astacus leptodactylus*) включает в

себя все виды рода *Pontastacus* [2]. Однако этот вопрос до сих пор остается открытым, хотя в научной литературе для обозначения родов уже используются термины *Caspiastacus* и *Pontastacus*.

Материалы и методы

Материалом для генетических исследований послужили особи *Astacus leptodactylus*, собранные летом 2011 г. вдоль западного побережья Каспийского моря, включая Киязинскую косу, Абшеронский полуостров и Прикуринский район. Сбор материала и их морфологический анализ осуществлялся по общепринятой методике в гидробиологических исследованиях. Собранные пробы для морфометрического анализа были фиксированы в растворе 4% формалина, а свежие образцы раков держали в холодном ледяном контейнере и доставляли в лабораторию, где были сохранены в 90% этаноле для выделения геномной ДНК из целого организма, предварительно удалив хитиновый покров. Таксономическая идентификация проводилась по определителям [3,4]. Выделение ДНК было проведено по методу Мор и Майер [12]. ДНК, используемая в исследованиях, была выделена из 30 образцов *Astacus leptodactylus*, по 10 особей с каждой популяции (Киязинская, Абшеронская и Прикуринская). Образцы ДНК были выделены из целого организма и для очистки геномной ДНК использована Кит (Wizard Genomic DNA Purification Kit), произведенной компанией Promega. Количество ДНК измеря-

лось путем чтения поглощений при 260 нм, а чистота ДНК была проверена путем вычисления соотношения значений оптической плотности при 260 нм и 280 нм. Исследования генетической изменчивости и генетического расстояния между отдельными популяциями (Килязинской, Абшеронской и Прикуринской) *Astacus leptodactylus* были проведены с помощью анализа ПЦР (полимеразная цепная реакция) амплификации со случайным амплифицированным полиморфной ДНК (RAPD). В анализах были использованы двадцать 10-мерных случайных праймеров (Operon Technologies, США). Стандартную ПЦР-реакцию проводили в MJ Research Peltier – Термоциклере (PTC-200) в 20 мкл реакционной смеси, состоявшей из геномной ДНК, 10 x ПЦР буфера, каждого дНТФ по 250мкМ, 50 пмоль праймера, 1,5 единиц Taq-ДНК полимеразы, 2,0 mM MgCl₂ и деионизированной воды до 20 мкл. Количественное определение ДНК было проведено на УФ области спектрофотометра. В качестве определения стандартного молекулярного веса были использованы ДНК маркеры, состоящие из 100 пар оснований. После выделения, образцы ДНК были смешаны с 7 мкл раствором бромфенолового синего (буфер для загрузки образцов) и 15 мкл ДНК смешанного продукта было загружено в 1,5% агарозном, в том числе 7%-ном полиакриламидном (ПААГ) геле, 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 с RAPD праймерами, в качестве матрицы была использована выделенная геномная ДНК.

Первоначально двадцать различных праймеров (ОРА01 - ОРА20) были испытаны при амплификации, десять из которых производили амплификацию, шесть, лучше амплифицирующие, были выбраны для даль-

нейших исследований. RAPD профили, созданные каждым набором праймеров были проверены для наличия или отсутствия амплификации продукта, с использованием агарозного геля. Все воспроизводимые и разрешимые полосы от 200 до 1500 (пар оснований) п.о. были отмечены на агарозном геле. Появление полосы на геле отмечалось цифрой 1, а ее отсутствие как 0. Результаты, полученные с использованием всеми десяти праймерами при RAPD анализе, затем были объединены для построения в единую матрицу данных, которая использована для оценки полиморфных локусов, генетических расстояний и построения UPGMA дендрограммы для популяций, с применением компьютерной программы POPGENE 1.32 [15]. Значения индекса сходства (SI) между RAPD профилями были рассчитаны на основе RAPD маркеров в соответствии по формуле: $SI = 2NAB / (NA + NB)$, где NAB - общие количества RAPD полос, которые разделяют особей A и B , а NA и NB - количества фрагментов, отмеченных для каждой особи, соответственно. Межпопуляционное сходство [S_{ij}] было рассчитано как среднее сходство между случайно выбранными парами особей из популяции i и j [11].

Результаты и обсуждение

Длиннопалый рак *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) по своим морфологическим, экологическим и физиологическим признакам является очень пластичным видом. В условиях Каспийского моря, по всему западному побережью, от Килязи до Прикуринского района, каждая популяция отличается по своей структурно-функциональной характеристике, имеет более независимую репродуктивную пространства и различимы по ряду морфологических признаков, особенно по строению клешни, роострума и тельсона [1]. Для характеристики популяционно-генетической структуры *Astacus leptodactylus* вдоль западного побережья Каспийского моря, включая Килязинскую косу, Абшеронский полуостров и

Прикуринский район, были исследованы особи выбранных популяций с помощью случайной амплификации полиморфной ДНК - RAPD праймеров. Олигонуклеотиды, производства Operon Technologies, США, были использованы для скрининга популяции, шесть из которых прекрасно амплифицировали (OPA03, OPA04, OPA07, OPA09, OPA10, OPA16) со всеми образцами использованных геномных ДНК (табл.1) и были использованы в дальнейших RAPD анализах.

Процентное отношение полиморфных полос из трех исследованных популяций колебалось от 57,77 до 87,81%. Средняя генетическая идентичность внутри популяций (S) для всех праймеров варьировала от 0,7550 до 0,7556 (табл.2). Наибольшее сходство генетической идентичности была выявлено в пределах Прикуринской популяции (0,7556), в то время как несколько ниже показателей сходства наблюдаются в Киязинской и Абшеронской популяциях 0,7554 и 0,7550, соответственно.

Среднее генетическое сходство между популяциями по всем праймерам варьировалось от 0,9049 до 0,9595. Межпопуляционный SI [Sij] для Абшеронской популяции по сравнению с Прикуринской был выше (0,9595), чем для популяции Абшеронская-Киязинская (0,9259) и Прикуринская-Киязинская (0,9049). Абшеронская популяция была ближе к Киязинской своим генетическим сходством (0,9259) в сравнении по тому же показателю между

популяциями Прикуринской и Киязинской, который был несколько ниже, что указывает на пространственную и репродуктивную изоляцию.

Генетическое расстояние между популяциями и кластерный анализ с UPGMA сгруппировал популяции в двух основных группах. Абшеронская и Прикуринская популяции были в одном кластере, в то время как Киязинская популяция была сгруппирована отдельно сама по себе. Генетическое расстояние было самым высоким, как 0,0999 для популяций Киязинской косы и Прикуринского района, в то время как низкое значение было 0,0413 для Абшеронской и Прикуринской популяций, которые, вероятно, очень близки по происхождению. Используемые шесть праймеров дали в общей сложности 402 различные полиморфные полосы, которые были использованы в дальнейших анализах. Из праймеров OPA09, OPA10 и OPA16 проявили наибольшее число полиморфных полос и, следовательно, высокого уровня полиморфизма. Процент от общего числа полиморфных полос для OPA09 составлял 78,33%, OPA10 - 87,81%, OPA16 - 78,91%, в то время как пределы размеров для OPA10 колебались от 300 до 1500 п.о., OPA09 и OPA16 - от 200 до 1500 п.о. (табл.1).

Представленные рисунки (рис.1,2 и 3) отображают RAPD профилей, амплифицированных тремя разными праймерами, использованных для пяти различных образцов из каждой популяции.

Таблица 1

Количество полос и геномные размеры фрагментов, полученных RAPD праймерами, амплифицирующих геномную ДНК *Astacus leptodactylus*

Праймеры	Секвенсы праймеров	Размеры фрагментов, пар основ	Амплифицированные полосы	Полиморфные фрагменты (%)
OPA03	AGTCAGCCAC	200-1500	64	71,11
OPA04	AATCGGGCTG	300-1500	52	57,77
OPA07	GAAACGGGTG	200-1500	66	73,33
OPA09	GGGTAACGCC	200-1500	70	78,33
OPA10	GTGATCGCAG	300-1500	79	87,81
OPA16	AGCCAGCGAA	200-1500	71	78,91

Таблица 2

**Общее количество полос, процент полиморфных полос и оценка сходства
в трех популяциях *Astacus leptodactylus***

Популяция	Общее количество полос (N)	Поли-морфные полосы (N)	Поли-морфные полосы (%)	Индекс сходства внутри популяции (S+SD)
Киязинская	60	50	83,33	0,7554±0,0245
Абшеронская	60	55	91,67	0,7550±0,0236
Прикуринская	60	46	76,67	0,7556±0,0229

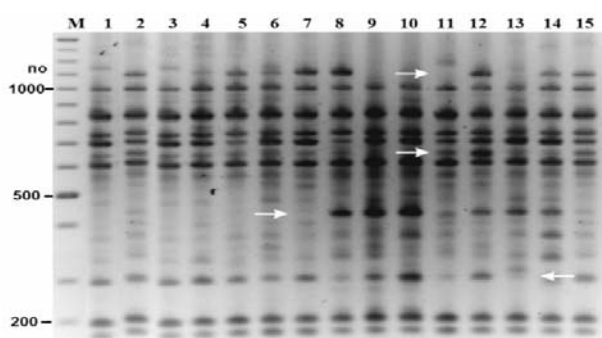


Рис. 1. RAPD профиль образцов *Astacus leptodactylus* с OPA09 RAPD праймером в 7%-ном ПААГ. М – 100 п.о. молекулярный маркер, 1-5 – особи Киязинской популяции; 6-10 – особи Прикуринской популяции; 11-15 – особи Абшеронской популяции. Стрелки показывают основные полиморфные полосы для каждой популяции

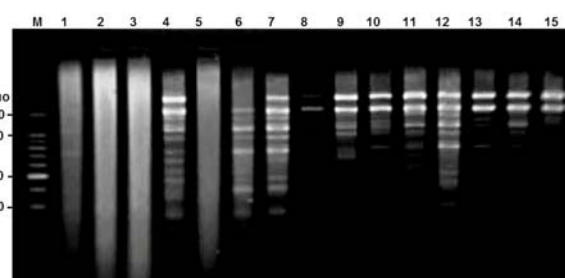


Рис. 3. RAPD профиль (полосы 1-15) образцов *Astacus leptodactylus* с OPA16 RAPD праймером в 1.5% агарозном геле. М – 100 п.о. молекулярный маркер, 1-5 – особи Киязинской популяции; 6-10 – особи Прикуринской популяции; 11-15 – особи Абшеронской популяции

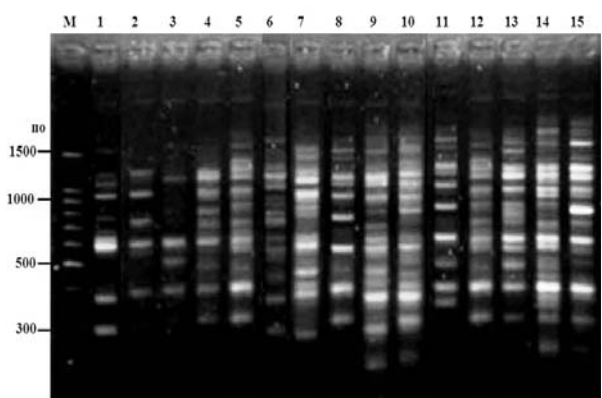


Рис. 2. RAPD профиль (полосы 1-15) образцов *Astacus leptodactylus* с OPA10 RAPD праймером в 1.5% агарозном геле. М – 100 п.о. молекулярный маркер, 1-5 – особи Киязинской популяции; 6-10 – особи Прикуринской популяции; 11-15 – особи Абшеронской популяции

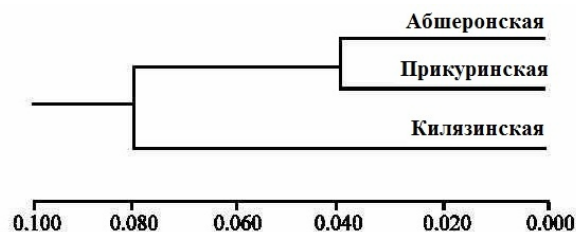


Рис. 4. UPGMA дендрограмма генетических расстояний на основе обобщения дифференциации межпопуляционных данных *A. leptodactylus* по RAPD-анализу

Значения генетических расстояний были переведены исходя из межпопуляционного сходства, с учетом исправлений значений внутри популяций [13]. Эти значения в дальнейшем были подвергнуты филогенетической реконструкции. UPGMA дендрог-

рамма, полученная на основе общих праймеров, указывает на три группы: популяция 1 (Абшеронская), популяция 2 (Прикуринская) и популяция 3 (Киязинская) (рис. 4). Прикуринская и Киязинская популяции имели наибольшее генетическое расстояние (0,0999), тогда как это значение для Абшеронской и Киязинской популяций составляло 0,0770. Генетическое расстояние для Абшеронской и Прикуринской популяций было самым низким (0,0413), что указывает на тесные родовые связи.

Анализы географической гетерогенности показывают на весьма существенные различия в частотах генотипов среди первой группы, которая объединяет Абшеронскую и Прикуринскую популяции по сравнению со второй (Киязинской популяцией). Из этого следует, что Киязинскую популяцию *A.leptodactylus* следует рассматривать как более обособленную группу.

Генетическое разнообразие длиннопалых раков в Каспийском море является результатом эволюционной истории развития подвидов и видов под воздействием естественного отбора в переменных условиях окружающей среды, где локальный естественный отбор в отличие от потока генов является мощной эволюционной силой. Генетический разрыв, наблюдаемый в дендрограмме, может быть объяснен ограничением потока генов, вызванном характером рельефа побережья, течений и северных ветров в Среднем и Южном Каспии.

Выводы

Настоящее исследование показало, что длиннопалые раки западного побережья Каспийского моря имеют явно отличимые морфометрические и генетические вариации. Результаты морфологических и молекулярно-биологических исследований показали, что особи Абшеронской и Прикуринской популяции являются более близкими формами и соответствуют виду *P.leptodactylus*, а особи Киязинской популяции – виду *P.eichwaldi*, выделенными Бродским и Старобогатовым [6,4], что отличается оп-

ределенной вариацией в морфологическом и генетическом планах.

Автор статьи выражает глубокую благодарность д.б.н. К.Г.Гасимову, заведующему лабораторией регуляторных систем клеток Института ботаники НАНА, за оказанную помощь при анализе результатов молекулярно-генетических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азизов А.П. Структурно-функциональная характеристика популяции *A.leptodactylus* Esch. на западном шельфе Азербайджанского сектора Каспийского моря/ Azərbaycan Zooloqlar Cəmiyyətinin əsərləri. Bakı, 2008, s. 417-421.
2. Борисов Р.Р. Десятиногие ракообразные континентальных водоемов Северной Евразии/ Актуальные проблемы изучения ракообразных континентальных вод, Ин-т биол. внутр. вод РАН, Борок, 2012, с.7-20.
3. Виноградов Л.Г. Отряд десятиногие ракообразные (Decapoda) /Атлас беспозвоночных Каспийского моря, М., 1968, с. 291-300.
4. Старобогатов Я.И. Отряд Decapoda / Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий, т. 2. Ракообразные / под общ. ред. С.Я. Цалолихина. СПб.: Наука, 1995, с. 174-183.
5. Albrecht H. Besiedlungsgeschichte und ursprünglich holozäne Verbreitung der europäischen Flusskrebse // Spixiana. 1983, v. 6, № 1, pp. 61-77.
6. Brodsky S.Y. On the systematics of Palaearctic crayfishes (Crustacea, Astacidae) // Freshwater Crayfish, 1983, v.5, pp. 464-470.
7. Bott R. Die flussekrebse europas (Decapoda, Astacidae) // Proc. Senckenberg Nat. Soc. 1950, v.483, pp. 1-36.
8. Crandall K.A., Harris D.J., Fetzner J.W Jr. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences // Proc. R. Soc. Lond. 2000, v. 267(1453), pp. 1679-1686
9. D'Udekem D'Acoz C. Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N//Collection Patrimoines Naturels, 1999, v. 40, 383 p.
10. Holdich D.M. Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries // Bull. Fr. Pêche, 2002, v. 367, pp. 611-650.
11. Lynch, M. Analysis Population Genetic Structure by DNA Fingerprinting// In: DNA Fingerprinting: Approaches and Applications, Burke, T., G. Dolf, A.J. Jeffreys and R. Wolff (Eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1991, pp. 113-126.

12. Mor, H. and G.C. Mayer. Diversity among isolates of *Verticillium lecanii* as expressed by DNA polymorphism and virulence towards *Bemisia tabaci* // Phytoparasitica, 1996, v. 24, pp. 111-118.
13. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics, 1978, 89, pp. 583-590.
14. S'mietana P., Schulz H.K., Keszka S., Schulz R. A proposal for accepting *Pontastacus* as a genus of

- European crayfish within the family Astacidae based on a revision of the west and east taxonomic literature // Bull. Fr. Pêche Piscic. 2006, v. 380-381, pp. 1041-1052
15. Yeh F., Yang C. and Boyle T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis // University of Alberta, Edmonton, 1999

Институт зоологии НАН Азербайджана

XƏZƏR DƏNİZİNDƏ UZUNBARMAQ XƏRÇƏNGLƏRİN *ASTACUS LEPTODACTYLUS* (ESCHSCHOLTZ, 1823) RAPD TEXNİKANIN TƏTBİQİ İLƏ POPULYASIYA-GENETİK XARAKTERİSTİKASI

Ə.P.Əzizov

Xəzər dənizində uzunbarmaq xərçənglərin *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) populyasiyalarının ilk dəfə RAPD texnologiyasının tətbiqi ilə genetik xarakteristikası verilmişdir. Tədqiqat zamanı çay xərçənglərinin uç müxtəlif – Abşeron, Kürətrafi və Giləzi populyasiyaları RAPD praymerlərdən istifadə edilməklə analiz olunmuşdur. Giləzi populyasiyasına nisbətən Abşeron və Kürətrafi populyasiyalar daha yaxın göstəricilərə malikdir. Giləzi populyasiyası isə bir sıra morfoloji əlamətlərə görə fərqlənir və bu, RAPD-PCR analizdə aydın görünür. Nəticələrin statistik analizi və UPGMA dendrogramma Giləzi populyasiyası ilə digər iki populyasiya arasında böyük fərqin olduğunu göstərir.

POPULATION-GENETIC CHARACTERISTICS OF CRAYFISH *ASTACUS LEPTODACTYLUS* (ESCHSCHOLTZ, 1823) OF THE CASPIAN SEA USING RAPD TECHNIQUE

A.P.Azizov

This study presents the analysis of the Population Characteristics of *Astacus leptodactylus* in the Caspian Sea for the first time by means of RAPD technology. In studies three different populations - Absheron, Kur-area and Kilyazi were analyzed with the application of RAPD primers. The obtained results revealed that Absheron and Kur-area populations have many similar characteristics compared to the Kilyazi population. Kilyazi population displays distinct variation in the morphological characteristics as well as in RAPD-PCR analysis. The statistical analysis and UPGMA dendrogram has also revealed the big difference between Kilyazi population and other two populations studied.