

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ
ДЛИННОПАЛОГО РАКА (*ASTACUS LEPTODACTYLUS* ESCH.)
В ОЗЕРАХ БРЕСТСКОЙ ОБЛАСТИ**

М. А. САСИНОВИЧ¹, А. М. СЛУКВИН², А. В. АЛЕХНОВИЧ²

*¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь,
e-mail: marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@jgc.by;*

*²Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь,
e-mail: alekhnovichav@gmail.com*

**GENETIC POLYMORPHISM OF POPULATIONS
OF NARROW-CLAWED CRAYFISH (*ASTACUS
LEPTODACTYLUS* ESCH.) IN THE LAKES OF BREST REGION**

M. A. SASINOVICH¹, A. M. SLUKVIN², A. V. ALEKHNOVICH²

*¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy
of Sciences of Belarus,
27 Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@jgc.by;*

*²Scientific and Practical Centre of the National Academy
of Sciences of Belarus for Bioresources,
27 Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus,
e-mail: alekhnovichav@gmail.com*

Аннотация. В статье рассматриваются результаты исследования генетического полиморфизма в популяциях длиннопалого рака в озерах Соминское и Олтуш Брестской области по двум митохондриальным генам. Показано, что в целом ген COI характеризуется достаточно низкой внутривидовой генетической вариативностью. Установлено, что у раков из озера Олтуш, она была в 1,4 раза ниже, чем у раков из озера Соминское (1,42 % и 2,04 % соответственно). Относительно гена 16s rRNA был установлен очень высокий уровень полиморфизма в популяциях раков для обоих озер (25,6 % для озера Соминское и 60,1 % для озера Олтуш).

Ключевые слова: длиннопалый рак, генетический полиморфизм, ген COI, ген 16s rRNA

Abstract. The article deals with the results of a study of genetic polymorphism in populations of narrow-clawed crayfish in the lakes of Sominsky and Oltush of Brest region for two mitochondrial genes. It is shown that, in general, the COI gene is characterized by a fairly low intraspecific genetic variability. It was found that in

crayfish population from Lake Oltush, it was 1.4 times lower than that of crayfish population from Lake Sominskoe (1.42 % and 2.04 %, respectively). Concerning the 16s rRNA gene, a very high level of polymorphism in the populations of crayfish was established for both lakes (25.6 % for Lake Sominskoe and 60.1 % for Lake Oltush).

Keywords: narrow-clawed crayfish, genetic polymorphism, COI gene, 16s rRNA gene

Введение. Изучение генетического полиморфизма у десятиногих раков имеет важное теоретическое и практическое значение, как для оценки биологического разнообразия в популяциях десятиногих раков, определения видового состава, обнаружения гибридных особей, оценки устойчивости раков к болезням, так и для разработки мероприятий по сохранению вида и увеличению промысловых запасов длиннопалого рака в водоемах Беларуси [1].

Анализ литературы по генетическим исследованиям длиннопалых раков показал, что при проведении работ, основанных на электрофорезе белков, были установлены низкие уровни вариаций в популяциях пресноводных раков [2, 3]. Ранее для проведения генетических исследований у десятиногих использовался RAPD-PCR анализ, однако результаты такого анализа оказались малоинформативными при оценке генетической гетерогенности в популяциях раков [4–6]. В течение последнего десятилетия были разработаны новые молекулярные методы, которые позволили обнаружить более высокую степень генетической изменчивости в популяциях пресноводных раков. В большинстве работ генетическая дифференциация популяций раков была оценена с использованием митохондриальной ДНК. Преимущества мтДНК как инструмента в генетических исследованиях популяций широко рассмотрены в литературе [7]. Так было установлено, что в связи с материнским режимом наследования мтДНК ее широко используют для исследования генетических различий и эволюционной истории между видами и внутри видов. Важным также является тот факт, что мтДНК способна сохранять историю прошлых изоляций даже в случае современного привнесения чужеродных групп.

Доказано, что мтДНК оказалась превосходным инструментом для изучения популяционной генетики животных выше или ниже видового уровня [8]. Ряд исследователей считают, что в будущем мтДНК может помочь в определении таксономического своеобразия отдельных групп раков, выбрать приоритеты для

реализации программ по сохранению видового разнообразия [9]. В последнее время мтДНК стали использовать как генетический маркер, способный идентифицировать видовую и популяционную принадлежность изучаемых гидробионтов [10–17]. Польскими коллегами было установлено, что для изучения генетической структуры в популяциях десятиногих раков наиболее информативными являются фрагменты генов мтДНК COI (680 п.н.) и 16S рРНК (530 п.н.) [18, 19].




Таким образом, для изучения генетического полиморфизма в популяциях длиннопалого рака в водоемах Брестской области были выбраны последовательности митохондриальной ДНК, а именно, фрагменты гена мтДНК COI (680 п.н.) и 16S рРНК (530 п.н.), которые являются наиболее информативными при проведении таких исследований.

Цель работы – оценить возможности использования двух митохондриальных генов (COI и 16S rRNA) для проведения работ по видовой идентификации и изучению генетического полиморфизма в популяциях длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающих в водоемах Брестской области.

Материалы и методы. Для генетических исследований прижизненным способом отобраны пробы у длиннопалого рака из наиболее ракопродуктивных озер Брестской области: Олтуш (Малоритский район) – 16 проб; Соминское (Ивацевичский район) – 15 проб. Биологический материал отбирался у взрослых особей, помещался с помощью стерильного пинцета в небольшие по объему (на 1,5 мл) пробирки типа Эппендорф и заливался 96 % этанолом. Для выделения ДНК использовался стандартный фенол-хлороформный метод выделения ДНК у десятиногих раков [7, 19]. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре IMPLEN spectrophotometer Nanogram (Germany). Качество выделенной ДНК проверяли электрофоретически в 2 % агарозном геле.

Все праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Минск). ПЦР осуществляли с использованием амплификатора C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, США). Для получения целевых фрагментов митохондриального гена цитохромоксидазы 1 субъединицы (COI) и гена 16S rRNA были использованы следующие пары праймеров и программы амплификации (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Отобранные для анализа праймеры и протоколы ПЦР

Название	Последовательность	Программа амплификации
LCO1490 forward	GGTCAACAATCATAAAGATATTGG	Иниц. денатурация 95 °С 90 сек.
		Денатурация 95 °С 30 сек. Отжиг 45 °С 60 сек.  5 циклов Элонгация 72 °С 90 сек.
HCO2198 reverse	TAAACTTCAGGGTGACSSAAAAATCA	Денатурация 95 °С 30 сек. Отжиг 55 °С 45 сек.  27 циклов Элонгация 72 °С 60 сек.
		Финальная элонгация 72 °С 7 мин.
16S-F	CCTGTTTANCAAAAACAT	Иниц. денатурация 95 °С 3 мин. Денатурация 95 °С 40 сек.  30 циклов Отжиг 53 °С 50 сек. Элонгация 72 °С 60 сек.
16S-R	AGATAGAAAACCAACCTGG	Финальная элонгация 72 °С 5 мин.

Реакционная смесь для ПЦР составляла 10 мкл: 5 мкл буфера DreamTaq PCR Master Mix (2X), 0,2 мкл каждого праймера, 3,6 мкл MiliQ и 1 мкл ДНК-матрицы. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 2 % агарозном геле с добавлением флуоресцентного красителя Ethidium bromide. Длины, получаемых в ходе реакции ампликонов (ПЦР-фрагментов), составили 680 п.н. и 530 п.н. для COI и 16s rRNA соответственно (рис. 1 и 2).

Продукты ПЦР сразу после амплификации очищали ферментами, добавляя в каждый образец по 0,3 мкл экзонуклеазы (Exo1) и по 0,9 мкл фосфатазы (FastAP) и инкубировали при 37 °С 30 минут. Для остановки реакции нагревали смесь до 80 °С 15 минут.

Для подготовки образцов к секвенированию, проводилась терминальная ПЦР. Реакционная смесь для ПЦР составляла 8 мкл: 1,6 мкл буфера BrightDye Terminator (Nimagen, Netherlands), 0,8 мкл терминатора BrightDye Terminator (Nimagen, Netherlands), 3,6 мкл MiliQ, 0,5 мкл прямого праймера и 1,5 мкл продуктов предыдущей ПЦР. Программа амплификации представлена в табл. 2.

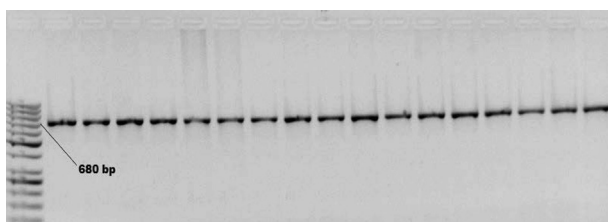


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена COI

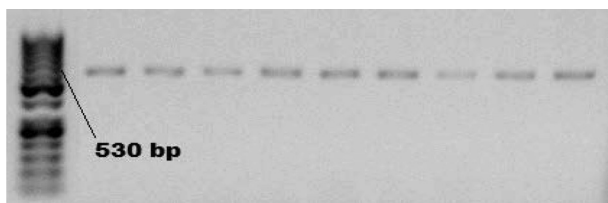



Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена 16s rRNA

Т а б л и ц а 2. Программа амплификации терминальной ПЦР

Иниц. денатурация 96 °С 1 мин. Денатурация 96 °С 10 сек. Отжиг 55 °С 5 сек. Элонгация 60 °С 4 мин.		40 циклов
---	---	-----------

Заключительным этапом при подготовки образцов для секвенирования являлась очистка терминатора после ПЦР по следующему протоколу:

- 1) по 30 мкл 96 % спирта в каждую пробирку;
- 2) по 2 мкл 5М уксусной кислоты, смесь перемешивалась на вортексе;
- 3) 30 минут смесь выдерживалась в морозильной камере;
- 4) центрифугирование 10 минут, супернатант сливался;
- 5) по 130 мкл 70 % спирта;
- 6) центрифугирование 10 минут, супернатант отбирался дозатором;
- 7) открытые пробирки ставились в термостат на 45 °С до полного высыхания осадка.

Проведение капиллярного электрофореза осуществлялось в Республиканском центре геномных биотехнологий.

Результаты секвенирования анализировались с помощью программы MEGA7.

Результаты исследований и обсуждение. Сравнение популяций озера Олтуш и Соминское по гену COI. Первым этапом в анализе последовательностей было их сравнение с уже известной, имеющейся последовательностью гена COI, размещенной в GenBank. Все образцы (31) были с 99 % вероятностью отнесены к нашему исследуемому виду *Astacus leptodactylus* Esch.

Следующим этапом в анализе последовательностей было их выравнивание с помощью программы MEGA7 (рис. 3).

После выравнивания размер последовательности гена COI составил 639 нуклеотидов у популяции озера Соминское, а у озера Олтуш 632 нуклеотида. После выравнивания последовательностей были рассчитаны парные генетические дистанции для каждой популяции. При расчете внутривидовых гене-

Species/Abbrv	Group Name	
1.94		CRATGATTTGGTSAACWTSAGSCKTRAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGYCAAC
2.95		AWGTTGATTTGGGNCYTGAGCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCACAC
3.96		EWGTTTTTKGGACYTGARCGRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCACACCA
4.97		TGCATCCCTGGTCRCACWBARKTSKTASTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCACACCA
5.98		AWKTTGATTTGGGMITGAGCGGAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCACACCA
6.99		WTVGCTTTKGRMICYTARSCKTRWAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGYCAACC
7.100		AKTWTGATTTGGGNCYTGAGSCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
8.101		CTTTGGKTTTTTTKGGMMYTTSACGGGAAWTAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
9.102		TTTTKTTTTTTGGGMITGACCGGAATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
10.103		CTTTGGTTTTTTGGGACTGAGCCGRRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
11.104		ATGTTGTTTTGGGACTGAGCCGRRATAAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
12.105		WTVGAKTTTTKGRMICYTARSCKTKAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
13.106		AAGTTKTTTTKGRMICYTARSCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC
14.107		GATGWATKTTTTKGRMICYTARSCKTKAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTC
15.108		GAGTTGTTTTGGGACCCGAAAGTCCCTAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCCGGTTGACCTAGGTCAC

До выравнивания

Species/Abbrv	Group Name	
1.94		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
2.95		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
3.96		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
4.97		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
5.98		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
6.99		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
7.100		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
8.101		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
9.102		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
10.103		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
11.104		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
12.105		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
13.106		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
14.107		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT
15.108		CCC TTT TCG TTT - GATCTGTATTTATTACGGCAGTTC TTTTACTCTTATCTTTA - CC GGTGTACAGGTCAT

После выравнивания

Рис. 3. Выравнивание последовательностей гена COI популяции *Astacus leptodactylus* озера Соминское

тических дистанций оказалось, что средние значения парных генетических дистанций в обеих популяциях, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена COI, имеют невысокие значения и различаются несущественно (оз. Соминское – 0,003, Олтуш – 0,002). Также не наблюдалось зависимости значения генетической дистанции от числа анализируемых последовательностей. Затем был проведен расчет процентного содержания переменных сайтов нуклеотидов, а также расчет процентного содержания синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов. Все расчеты также производились в программе MEGA7. Как

Name	G	C	G	G	T	A	A	A	T	T	T	T	A	T
1. 94
2. 95
3. 96
4. 97
5. 98
6. 99
7. 100
8. 101
9. 102
10. 103
11. 104
12. 105
13. 106
14. 107
15. 108	C

Name	T	G	W	T	V	Y	P	P	L	A	S	S	I	A
1. 94
2. 95
3. 96
4. 97
5. 98
6. 99
7. 100
8. 101
9. 102
10. 103
11. 104
12. 105
13. 106
14. 107
15. 108

Рис. 4. Вариабельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене COI популяции озера Соминское

видно на рис. 4 в анализируемых последовательностях популяции озера Соминское было обнаружено 13 вариабельных сайтов нуклеотидов из 639.

Процентное содержание вариабельных сайтов рассчитывалось по формуле:

$$I = V \times 100 \% / D,$$

где I – процент вариабельных сайтов; V – число вариабельных сайтов; D – общая длина последовательности.

Таким образом, процент вариабельных сайтов нуклеотидов у раков по озеру Соминское составил 2,04 %.

Расчет процентного содержания несинонимичных замен осуществляется по той же формуле:

$$N = V_n \times 100 \% / D,$$

где N – процент несинонимичных замен нуклеотидов; V_n – число несинонимичных замен нуклеотидов; D – общая длина последовательности.

Число синонимичных замен рассчитывается по формуле:

$$S = I - N,$$

где S – процент синонимичных замен нуклеотидов; I – процент переменных сайтов; N – процент несинонимичных замен нуклеотидов.

Таким образом, процент несинонимичных замен составил 0,47 %, а число синонимичных – 1,57 %.

При анализе данных, полученных для раков из популяции озера Олтуш, было установлено, что число переменных сайтов нуклеотидов было 9 из 632 нуклеотидов и 6 аминокислот из 210. Таким образом, процент переменных нуклеотидов составил 1,42 %, из которых несинонимичных замен 0,95 %, а синонимичных – 0,47 %. На основании полученных результатов, можно заключить, что ген COI у *Astacus leptodactylus* характеризуется низкой внутривидовой вариабельностью. Внутривидовые генетические дистанции по отдельным участкам гена COI существенно не различаются. Нуклеотидные последовательности отдельных участков гена обладают высоким, иногда 100 % сходством. В то же время наличие внутривидовой вариабельности, обеспеченное нуклеотидными заменами, подтверждает применимость этого гена для диагностики не только видов, но внутривидовых форм.

Число переменных сайтов нуклеотидов в последовательностях гена COI популяции раков озера Соминское в 1,44 раза выше, чем озера Олтуш, однако процентное содержание несинонимичных замен было в 2 раза выше в популяции рака в озере Олтуш, чем в озере Соминское. При оценке видовой принадлежности раков по гену COI было установлено (с вероятностью 99 %), что в обоих озерах обитает вид десятиногих раков – длинопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.).

Сравнение популяций озера Олтуш и Соминское по гену 16s rRNA. Также, как и для гена COI, первым этапом в анализе последовательностей было их сравнение с уже известной, имеющейся последовательностью гена 16s rRNA, размещенной в GenBank. Все 31 экз. образцов были с 83–95 % вероятностью

отнесены к исследуемому виду длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.), однако имелось также и большое сходство с близкородственным видом *Astacus astacus*. Следующим этапом в анализе последовательностей было их выравнивание с помощью программы MEGA7. Следует отметить, что уже на этом этапе было заметно большое количество нуклеотидных замен и вставок в последовательностях обеих популяций раков (рис. 5).

После выравнивания размер последовательности гена 16s rRNA составил 500 нуклеотидов у популяции озера Соминское, а у озера Олтуш – 487 нуклеотидов. После того как последовательности были подготовлены, были рассчитаны парные генетические дистанции для каждой популяции. При расчете внутривидовых генетических дистанций оказалось, что средние значения парных генетических дистанций в обеих популяциях, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена, имеют более высокие значения, чем рассчитанные для гена COI, и сильно

Species/Al Group Name	
1. 94	T T A T G A C C S T G C T A A G G T A S C R T A A T C A T T A G C T C T T T T A A T T S A A G S C T G G W A T R A A T T
2. 95	G C S S T A T T A T G A C C S T G C T A A S S T A G C S T A A T C A T T A S C C T T T T A A T T S A A S C T G G A
3. 96	G C T Y G T A S C S T A A T C A T A G A C A A S T A A T T G A A S C S G S A A T A A A T S T T G G A C A A S A
4. 97	G G T A T T A T G A C C S T C T A A G S T A S C S T A A T C A T T A A A A A A A A K G A A G G C T G S A A A
5. 98	A A S S T A S C S T A A T C A T T A S R C A A T A A T T A A S S C T G S A A T A A A T G T T G G A C A S A A A
6. 99	G C T C S G S T A S C S T A A T T A T T A G S S C A A G A A T T A A S S C T G S A A T A A A T G T T G S C A A A
7. 100	C S G S T A T T A T G A C C S T G C T A A G S T A G C S T A A T C M T T A S T C T T T T A A T T S A A S S C T G G A
8. 101	Y A T T A T G A C C G W S T A A S S T A S C S T A A T R G A A S C C C C T T W A S S C T G S A A T A A A T C S T
9. 102	A T T A T G A C C S T G C S T A A S S T A S C S T A C C T A C T A T T C T T T T A A T T G A A S S C T G G A C C A T
10. 103	G C C C S G S T A T T A T A S C S T G C T A A G S T A S C S T A A T T G A A A A G A C S T T T T A A T T G A A S S C T
11. 104	A T G A C C S T G C T A A S S T A S C S T A A T C A T T A G C T T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T S S
12. 105	T T A T G A C C S T G C T A A S S T A S C R T A A T C M T T A G C T C T T T T A A T T G A A S S C T G G W A T R A A T
13. 106	A T G A C C S T G C T A A S S T A S C R T A A T C M T T A K T C T T T T A A T T G A A S S C T G S A A T R A A T T G
14. 107	T A T G A C C S T G C T A A S S T A S C G C A A E C A T T A G C T T T T A A T T G A A S S C T G G A A A A T T G
15. 108	T T A T G A C C S T G C T A A S S T A S C R T A A T C A T T A G C T C T T T T A A T T G A A S S C T G G W A T R A A T

До выравнивания

Species/Abbrv Group Name	
1. 94	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
2. 95	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
3. 96	A A G T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
4. 97	A A A A A T T G A A S S C T G G A A A A A A T G G T T G G A C A A S A A C C A A S C T T C T T A A A T A A A A
5. 98	A A T A A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S T T G T C T T A A A T A A A A
6. 99	A A G T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C S G C T T A A A T A A A A
7. 100	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
8. 101	A S C C C C T T A A S S C T G G A A T A A A T G G T G G A C A A A S A A T A A A A G S S A A A A T A A A A
9. 102	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A C C A A T G G T C G G A C A A C A A C T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
10. 103	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
11. 104	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
12. 105	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
13. 106	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
14. 107	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A
15. 108	T T T T A A T T G A A S S C T G G A A T A A A T G G T T G G A C A A S A A A T A A S C T G T C T T A A A T A A A A

После выравнивания

Рис. 5. Выравнивание последовательностей гена 16s rRNA популяции *Astacus leptodactylus* озера Соминское

различаются между двумя популяциями (оз. Соминское – 0,052, оз. Олтуш – 0,269).

Следующим этапом анализа был расчет процентного содержания переменных сайтов нуклеотидов, а также расчет процентного содержания синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов. Все расчеты также производились в программе MEGA7.

Процентное содержание переменных сайтов рассчитывалось по той же формуле, что и для гена COI.

Таким образом, процент переменных сайтов нуклеотидов ДНК раков оказался высоким для обоих озер (25,6 % и 60,1 % для озер Соминское и Олтуш соответственно), что согласно последним литературным данным является характерным для генов митохондриального генома среди гидробионтов при отборе на адаптацию к экстремальным условиям среды обитания [20].

Дальнейшее вычисление синонимичных и несинонимичных замен оказалось уже невозможным, так как процент изменчивости нуклеотидных сайтов оказался слишком высок для этого гена. Наибольшую изменчивость по гену 16s rRNA показала популяция длиннопалого рака в озере Олтуш.

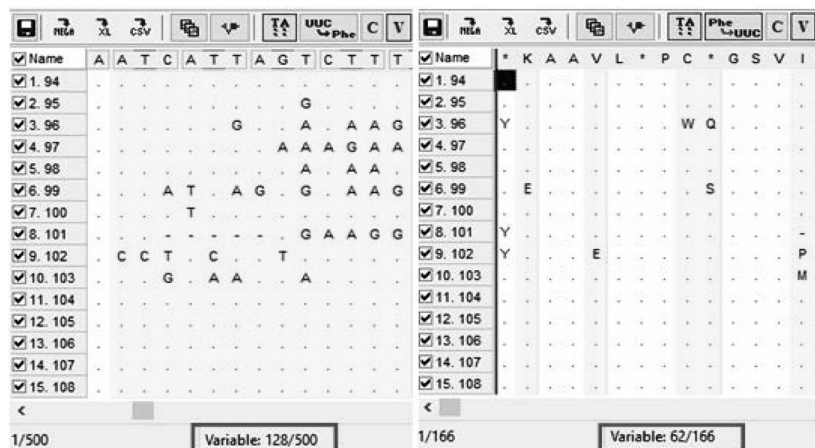


Рис. 6. Вариабельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене 16s rRNA популяции озера Соминское

<input type="checkbox"/> Name C A A A G G G G C C G C C <input checked="" type="checkbox"/> Name Q S G R R I M T V L S * R N																							
<input checked="" type="checkbox"/> 1. 109	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 109
<input checked="" type="checkbox"/> 2. 110	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 2. 110	L	K
<input checked="" type="checkbox"/> 3. 111	A	C	C	<input checked="" type="checkbox"/> 3. 111	K	.	P
<input checked="" type="checkbox"/> 4. 112	.	T	.	.	.	A	<input checked="" type="checkbox"/> 4. 112	L
<input checked="" type="checkbox"/> 5. 113	T	T	.	.	A	.	.	T	.	A	.	.	<input checked="" type="checkbox"/> 5. 113	L	K	.	.	K	N	P	L	.	* Y L L
<input checked="" type="checkbox"/> 6. 114	.	T	.	G	-	A	<input checked="" type="checkbox"/> 6. 114	L	-
<input checked="" type="checkbox"/> 7. 115	.	T	.	.	.	A	<input checked="" type="checkbox"/> 7. 115	L	-
<input checked="" type="checkbox"/> 8. 116	.	T	.	.	.	A	<input checked="" type="checkbox"/> 8. 116	L	-
<input checked="" type="checkbox"/> 9. 117	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 9. 117	L	K
<input checked="" type="checkbox"/> 10. 118	.	T	.	.	A	<input checked="" type="checkbox"/> 10. 118	L	-
<input checked="" type="checkbox"/> 11. 119	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 11. 119	L	K
<input checked="" type="checkbox"/> 12. 120	T	T	.	.	A	.	.	T	.	A	.	.	<input checked="" type="checkbox"/> 12. 120	L	K	.	.	-	I	.	L	.	* Y L L
<input checked="" type="checkbox"/> 13. 121	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 13. 121	L	K
<input checked="" type="checkbox"/> 14. 122	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 14. 122	L	K
<input checked="" type="checkbox"/> 15. 123	.	T	.	.	.	A	<input checked="" type="checkbox"/> 15. 123	L	-
<input checked="" type="checkbox"/> 16. 124	.	T	.	.	A	A	<input checked="" type="checkbox"/> 16. 124	L	K

1/487 Variable: 293/487 1/162 Variable: 127/162

Рис. 7. Вариабельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене 16s rRNA популяции озера Олтуш

Выводы. При оценке видовой принадлежности раков по гену COI мтДНК было установлено (с вероятностью 99 %), что в обоих озерах обитает вид десятиногих раков – длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.). Продемонстрировано также, что в целом ген COI характеризуется достаточно низкой внутривидовой генетической вариабельностью.

Установлено, что у раков из озера Олтуш она была в 1,4 раза ниже, чем у раков из озера Соминское (1,42 % и 2,04 % соответственно).

Относительно генетической вариабельности гена 16s rRNA был установлен очень высокий уровень полиморфизма в популяциях раков для обоих озер (25,6 % и 60,1 % для озер Соминское и Олтуш соответственно), что является характерным для генов митохондриального генома среди гидробионтов при отборе на адаптацию к экстремальным условиям среды обитания.

Высокие уровни полиморфизма по гену 16s rRNA у длиннопалых раков из озер Соминское и Олтуш (при дополнительном исследовании раков из этих озер на наличие возбудителя рачьей

чумы, других возбудителей инфекционной и паразитарной природы) дают нам основание полагать, что маточные стада из этих озер обладают высокой степенью генетического полиморфизма и могут быть пригодны для интродукцирования в другие озера Брестской области, соответствующие оптимальным условиям для обитания длиннопалых раков.

В ходе исследований была адаптирована методика прижизненного отбора биологического материала у длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), а также усовершенствована методика выделения ДНК из мышечной ткани длиннопалого рака. Впервые в стране был создан банк ДНК и биологических образцов длиннопалого рака (акты от 21.11.2016 г. о передаче биологического материала и ДНК в Республиканский банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов).

Работа выполнена в рамках задания 2.11 «Изучение генетического разнообразия водных и околководных беспозвоночных» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» 2016–2020 гг., подпрограммы «Структурная и функциональная геномика».

Список использованных источников

1. Алехнович, А. В. Рациональное использование и охрана ресурсов речных раков Беларуси / А. В. Алехнович, В. Ф. Кулеш // Природ. ресурсы : межведомств. бюл. – 2005. – № 1. – С. 34–43.
2. Agerberg, A. Genetic variation in three species of freshwater crayfish, *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Esch and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis / A. Agerberg // Hereditas. – 1990. – Vol. 113. – P. 101–108.
3. Fevolden, S. E. Allozymic variation among populations of noble crayfish, *Astacus astacus* L., in southern Norway: implications for management / S. E. Fevolden, T. Taugbol, J. Skurdal // Aquat. Fish. Manag. – 1994. – Vol. 25. – P. 927–935.
4. Азизов, А. П. Популяционно-генетическая характеристика длиннопалых раков *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) Каспийского моря с применением RAPD техники / А. Азизов // Докл. НАН Азербайджана. – 2014. – № 1. – С. 1–7.
5. Macaranas, J. M. Assessment of genetic variation in wild populations of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens 1868) by means of allozyme and RAPD-PCR markers / J. M. Macaranas [et al.] // Mar. Freshwater Res. – 1995. – Vol. 46. – P. 1217–1228.
6. Gouin, N. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austroprotopotambius pallipes*, assessed using RAPD markers / N. Gouin [et al.] // Hereditas. – 2001. – Vol. 87. – P. 80–87.

7. Schulz, R. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations / R. Schulz // Bull. Fr. Pêche Piscic. – 2000. – No. 356. – P. 123–138.
8. Avise, J. C. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. – New York, NY: Chapman and Hall, 1994. – 511 p.
9. Moritz, C. Animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic / C. Moritz, T. E. Dowling, W. M. Brown // Annu. Rev. Eco. System. – 1987. – Vol. 18. – P. 269–292.
10. Слуквин, А. М. Генетическая идентификация стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области по микросателлитным маркерам / А. М. Слуквин, О. Ю. Конева, М. И. Лесюк // Молекуляр. и приклад. генетика. – 2009. – Т. 9. – С. 146–152.
11. Billington, N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions / N. Billington, D. N. Hebert // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1991. – Vol. 48. – P. 80–94.
12. Largiader, C. R. Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers / C. R. Largiader [et al.] // Mol. Eco. – 2000. – Vol. 9. – P. 25–37.
13. Liua, Z. J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics / Z. J. Liua, J. F. Cordes // Aquaculture. – 2004. – Vol. 238. – P. 1–37.
14. Fopp-Bayat, D. Microsatellite DNA analysis of starlet (*Acipenser ruthenus* Brandt) from the five European river drainage areas / D. Fopp-Bayat [et al.] // Aktualny stan i aktywna ochrona naturalnych populacji ryb jesiotrowatych zagrozonych wyginaniem: Olsztyn. – 2008. – P. 223–234.
15. Барминцева, А. Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (Acipenseridae) и выявления особей гибридного происхождения / А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге // Генетика животных. – 2013. – Т. 49, № 9. – С. 1093–1105.
16. Мюге, Н. С. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н. Мюге [и др.] // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 7. – С. 913–919.
17. Слуквин, А. М. Эффективный способ видовой идентификации и обнаружения гибридов у стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) / А. М. Слуквин // Вопр. рыб. хоз-ва Беларуси. – 2015. – № 31. – С. 168–177.
18. Soroka, M. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species / M. Soroka // Polish J. Nat. Sci. – 2008. – Vol. 23, No. 3. – P. 624–634.
19. Skuza, L. Molecular characterization of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA / L. Skuza // Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems. – 2016. – № 13. – P. 417–422.
20. Consuegra, S. Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species / S. Consuegra, J. Elgan, E. Verspoor // Genetics Selection Evolution. – 2015. – P. 47–58.