

## ВОДНІ БІОРЕСУРСИ

---

---

УДК 595.384:575.17

### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИННОПАЛОГО РАКА (*Astacus leptodactylus* Esch.) В ОЗЕРАХ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ

<sup>1</sup>Сасинович М.А., <sup>1</sup>Слуквин А.М., <sup>2</sup>Алехнович А.В.

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27,  
marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@igc.by;

<sup>2</sup>ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»  
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27,  
alekhnovichav@gmail.com

В статье изложены результаты проведенных работ по генотипированию и изучению генетического полиморфизма длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающего в озерах Олтуш и Соминское Брестской области. Использовались два митохондриальных гена – COI и 16s rRNA.

При оценке видовой принадлежности раков по гену COI мт ДНК было установлено, что в обоих озерах с вероятностью 99% обитает вид десятиногих раков – длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.).

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.

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

Ключевые слова: длиннопалый рак, генетический полиморфизм, генотипирование, биологический материал, банк ДНК.

---

**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 промышленных запасов длиннопалого рака в водоемах Беларуси [1]. Анализ литературы по генетическим

исследованиям у 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; 5; 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 генотипирования и изучения генетического полиморфизма 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 генотипированию и изучению генетического полиморфизма длиннопалого рака (*Astacus leptodactylus* Esch.), обитающего 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.

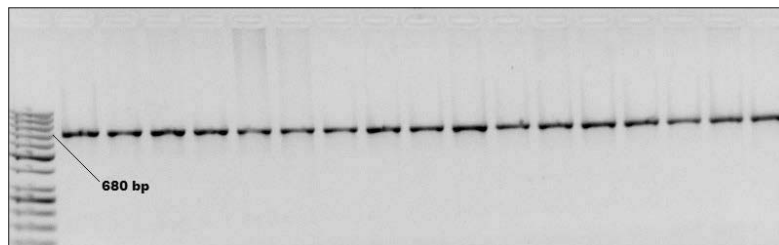
Все праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Минск). ПЦР осуществляли с использованием амплификатора C1000™ ThermalCycler (Bio-Rad, США). Для получения целевых фрагментов митохондриального гена цитохромоксидазы 1 субъединицы (COI) и гена 16SrRNA были использованы следующие пары праймеров и программы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

Таблица 1. Отобранные для анализа праймеры и протоколы ПЦР

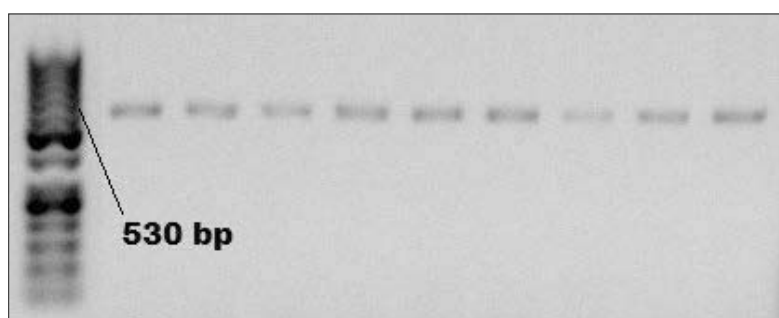
Название	Последовательность	Программа амплификации
LCO1490 forward	GGTCAACAATCATA AAGATATTGG	 1. Иниц. денатурация 95°C 90 сек. 2. Денатурация 95°C 30 сек. 3. Отжиг 45 °C 60 сек. 5 циклов 4. Элонгация 72°C 90 сек. 5. Денатурация 95 °C 30 сек. 6. Отжиг 55°C 45 сек. 27 циклов 7. Элонгация 72°C 60 сек. 8. Финальная элонгация 72 °C 7 мин.
HCO2198 reverse	TAAACTTCAGGGTG ACCAAAAAATCA	
16S-F	CCTGTTTANCAAAAACAT	Иниц. денатурация 95°C 3 мин. Денатурация 95°C 40 сек. Отжиг 53 °C 50 сек. 30 циклов Элонгация 72°C 60 сек. Финальная элонгация 72 °C 5 мин.
16S-R	AGATAGAAACCAACCTGG	

Реакционная смесь для ПЦР составляла 10 мкл: 5 мкл буфера DreamTaqPCRMasterMix (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 Ethidiumbromide. Длины, получаемых в ходе реакции ампликонов (ПЦР-фрагментов) составили 680 п.н. и 530 п.н. для COI и 16SrRNA, соответственно (рисунки 1 и 2).



*Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена COI*



*Рис.2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена 16srRNA*


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 оС 30 минут. Для остановки реакции нагревали смесь до 80 оС 15 минут.

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

Заключительным этапом при подготовке 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.

Табл. 2. Програма ампліфікації терминальної ПЦР

1. Иниц. денатурація 96°C 1 мин.	 40 циклов
2. Денатурація 96°C 10 сек.	
3. Отжиг 55 °C 5 сек.	
4. Элонгация 60 °C 4 мин.	

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.

**До выравнивания**

Species/Abbrev	Group Name	Sequence
1. 94		GRGATGATTTGGTSSKCVTGAASKTRAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
2. 95		AWGTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
3. 96		FWGTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
4. 97		TCGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
5. 98		AWGTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
6. 99		AWGTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
7. 100		AKWTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
8. 101		CTTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
9. 102		TTTKTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
10. 103		CTTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
11. 104		ATTTGATTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
12. 105		AWTGAWKTTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
13. 106		AACTTKTTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
14. 107		GATGWAATKTTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC
15. 108		AGTTTGGTCCMCYTGAACCKKAAATAGTGGGAACCTCTTTAAGAAATAATATTCGGTTGAGCTAGGTCACAC

**После выравнивания**

Species/Abbrev	Group Name	Sequence
1. 94		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
2. 95		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
3. 96		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
4. 97		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
5. 98		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
6. 99		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
7. 100		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
8. 101		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
9. 102		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
10. 103		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
11. 104		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
12. 105		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
13. 106		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
14. 107		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT
15. 108		CCCTTTTCTTTT-GATCTGATTTTATTTACGGCAGTTCCTTTTACCTTTATCTTTA--CCGGTGTAGCAGGTCGTAT

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

При расчете внутривидовых генетических дистанций оказалось, что средние значения парных генетических дистанций в обеих популяциях, рассчитанные по белок-кодирующим областям гена COI, имеют невысокие значения и различаются незначительно (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 видно на рисунке 4, в анализируемых последовательностях популяции озера Соминское было обнаружено 13 переменных сайтов нуклеотидов из 639.

M7: Sequence Data Explorer (Left - Amino Acid Sites)											M7: Sequence Data Explorer (Right - Nucleotide Sites)																		
Name	G	C	G	G	T	A	A	A	T	T	T	T	A	T	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. Варибельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене COI популяции озера Соминское**

Процентное содержание переменных сайтов рассчитывалось по формуле:

$I = V * 100\% / D$ , где I – процент переменных сайтов; V – число переменных сайтов; D – общая длина последовательности.

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

Расчет процентного содержания несинонимичных замен осуществляется по той же формуле:

$N=V_n*100\%/D$ , 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 вариабельных 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 вариабельных сайтов нуклеотидов было 9 из 632 нуклеотидов и 6 аминокислот из 210.

Таким образом, процент вариабельных 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 и внутривидовых форм. Число вариабельных 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, что в обоих озерах, обитает вид десятиногих раков – длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) (с вероятностью 99%).

#### **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 16srRNA, 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 (рисунок 5).





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

Рис. 7. Вариабельные сайты нуклеотидов (справа) и аминокислот (слева) в гене 16srRNA популяции озера Олуш

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

Таким образом, процент вариабельных сайтов нуклеотидов ДНК раков оказался высоким для обоих озер (25,6% и 60,1% для озер Соминское и Олуш, 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 варибельности нуклеотидных сайтов оказался слишком высок для этого гена. Наибольшую варибельность по гену 16srRNA показала популяция длиннопалого рака в озере Олтуш.

**Заключение.** При оценке видовой принадлежности раков по гену COI мтДНК было установлено, что в обоих озерах обитает вид десятиногих раков – длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) (с вероятностью 99%). Продемонстрировано также, что в целом ген COI характеризуется достаточно низкой внутривидовой генетической варибельностью. 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 варибельности 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 [20]. Высокие уровни полиморфизма по гену 16s rRNA у длиннопалых раков из озер Соминское (Ивацевичский район) и озера Олтуш (Малоритский район) (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 озёр обладают высокой степенью генетического полиморфизма и могут быть пригодны для интродукцирования в другие озёра 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 околоводных беспозвоночных» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» 2016-2020 гг., подпрограммы «Структурная и функциональная Геномика».

## ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ДОВГОПАЛОГО РАКУ (*Astacus leptodactylus* ESCH.) В ОЗЕРАХ БІЛОРУСЬКОГО ПОЛІССЯ

<sup>1</sup>Сасіновіч М.О., <sup>1</sup>Слуквін О.М., <sup>2</sup>Алехнович А.В.

<sup>1</sup>Інститут генетики і цитології НАН Білорусі,  
marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@jgc.by;

<sup>2</sup>ДНВО «Науково-практичний центр НАН Білорусі з біоресурсів»,  
alekhnovichav@gmail.com

У статті викладені результати проведених робіт щодо генотипування та вивчення генетичного поліморфізму довгопалого раку (*Astacus leptodactylus* Esch.), що мешкає в озерах Олтуш і Соминське Брестської області. Використовувалися два мітохондріальні гени – COI і 16s rRNA.

При оцінці видової приналежності раків за геном COI мтДНК було встановлено, що в обох озерах з імовірністю 99% мешкає вид десятиногого раку – довгопалий рак (*Astacus leptodactylus* Esch.).

У ході досліджень було адаптовано методику прижиттєвого відбору біологічного матеріалу у довгопалого раку (*Astacus leptodactylus* Esch.), а також удосконалено методику виділення ДНК з м'язової тканини довгопалого раку.

Уперше в країні було створено банк ДНК і біологічних зразків довгопалого раку.

Роботу виконано в рамках завдання 2.11 «Вивчення генетичного різноманіття водних і навколоводних безхребетних» Державної програми наукових досліджень «Біотехнології» 2016-2020 рр., підпрограми «Структурна і функціональна Геноміка».

Ключові слова: довгопалий рак, генетичний маркер, генетичний поліморфізм, генотипування, біологічний матеріал, банк ДНК.

## GENETIC POLYMORPHISM OF LONG-CLAWED CRAYFISH (*Astacus leptodactylus* Esch.) IN THE LAKES OF THE BELARUS POLESIA

<sup>1</sup>Sasinovich M.A., <sup>1</sup>Slukvin A.M., <sup>2</sup>Alekhovich A.B.

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus  
Republic of Belarus, 220072, Minsk, Academicheskaya Street, 27,  
marina.sasinovich@yandex.ru; A.Slukvin@jgc.by;

<sup>2</sup>SSPO «Scientific and Practical Center for Bioresources NAS of Belarus»  
Republic of Belarus, 220072, Minsk, Academicheskaya Street, 27,  
alekhnovichav@gmail.com

The article presents the results of the work on genotyping and the study of the genetic polymorphism of long-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) living in the lakes of Oltush and Sominsk, Brest region. Two mitochondrial genes, COI and 16s rRNA, has been used.

When assessing the species of crayfish by the COI mtDNA gene, it was found that in both lakes, with a probability of 99%, there was a species of decapod crayfish – a long-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.).

In the course of the research, the technique of the lifetime selection of biological material in long-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) was adapted, and the method for isolating DNA from the muscle tissue of long-clawed crayfish was improved.

For the first time in the country, a bank of DNA and biological samples of long-clawed crayfish has been created.

The work was performed as part of task 2.11 “Study of the genetic diversity of aquatic and near-water invertebrates” of the state program of scientific research “Biotechnology” 2016-2020, the subprogram “Structural and functional Genomics”.

Key words: long-clawed crayfish, genetic polymorphism, genotyping, biological material, bank of DNA.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алехнович А.В. Речные раки Беларуси в современных условиях: распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал / Минск: Беларуская навука, 2016. 303 с.
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. *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. Доклады 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 [et al.]. *Marin Freshwater Res.* 1995. Vol. 46. P. 1217–1228.
6. Gouin N. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*, assessed using RAPD markers / N. Gouin [et al.]. *Heredity*. 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. *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. Молекулярная и прикладная 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.]. *Aktualnystaniaktywnaochronanaturalnychpopulacjirybjesiotrowaty chz agrozonnychwyginięciem: 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.). *Вопросы рыбного хозяйства Беларуси.* 2015. № 31. С. 168–177.
18. Soroka M. Application of mitochondrial DNA in the identification of diverse crayfish species. *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. *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.