

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦІЇ СТЕРЛЯДІ (*ACIPENSERRUTHENUS*) ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ МАРКЕРАМИ ДНК

О. О. Малишева, науковий співробітник відділу молекулярно-діагностичних досліджень

В. Г. Спиридонов, завідувач відділу молекулярно-діагностичних досліджень

Національний університет біоресурсів і природокористування України

С. Д. Мельничук, директор Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК

*Проаналізовано внутрішньовидову генетичну структуру популяції стерляді (*Acipenser ruthenus*), яка вирощується в умовах аквакультури. Дослідження проводили за наступними ДНК-маркерами: LS-19, LS-68, LS-39, Aox-27, LS-54 та Aox-45. В результаті найбільш інформативними та поліморфними виявилися локуси LS-68 та Aox-45, а локуси Aox-27 та LS-54 виявилися мало інформативними для досліджуваної популяції стерляді. На основі проведених досліджень та розрахунків спостерігається зменшення гетерозиготних алельних варіантів, що може призвести до виродження даної популяції в умовах штучного рибозоведення.*

Ключові слова: стерлядь, мікросателітні маркери ДНК, генетична структура, поліморфізм, гетерозиготність.

Вступ. У зв'язку з тим, що осетрові (*Acipenseridae*) є цінними об'єктами як вітчизняної, так і світової аквакультури, виникає особливий інтерес до їх відтворення та товарного вирощування. Варто зазначити, що осетрові належать до зникаючих видів, які занесені до Червоної книги, промисел на них заборонений, крім того, майже всі представники родини осетрових внесені до списку конвенції CITES, яка на міжнародному рівні регулює захист та торгівлю зникаючими та рідкісними видами тварин [1, 2].

Одним з представників родини осетрових є стерлядь (*Acipenser ruthenus*), яка до сьогодні залишається одним із основних об'єктів товарного осетрівництва. Стерлядь характеризується відносно невеликими розмірами та швидкими, у порівнянні з іншими осетровими, строками настання статевої зрілості [3, 4]. Як цінний об'єкт промислового та штучного відтворення стерлядь дуже активно використовується з метою розведення, як для природного відтворення популяції, так і для товарного вирощування [5].

У зв'язку з цим виникає необхідність у застосуванні сучасних способів контролю за генетичними процесами, які відбуваються у штучно відтворюваних популяціях [6].

Одним з інструментів моніторингу за ефективністю відтворення та збереження популяції виступають молекулярно-генетичні методи досліджень із застосуванням мікросателітних локусів ДНК [7].

Мікросателітні локуси - це поліморфні послідовності ДНК, які містять короткі тандемні повтори нуклеотидів. Мікросателіти розподілені по геному і демонструють високі рівні внутрішньовидового алельного поліморфізму. Ці унікальні властивості використовують для ідентифікації та подальшої характеристики геному різних видів флори і фауни. Тому, мікросателітні маркери дозволяють оцінити внутрішньовидовий генетичний поліморфізм і надають можливість спостері-

гати за різницею між популяціями через високий рівень алельних варіацій [7, 8].

Завдяки останнім розробкам у сфері молекулярно-генетичних досліджень у рибництві були виявлені мікросателітні маркери для 33 видів осетрових риб [8, 9]. На теперішній час у молекулярно-генетичних дослідженнях осетрових досить широко використовуються тринуклеотидні (LS-19, LS-34, LS-39, LS-57, Aox-23, Aox-45) та тетрануклеотидні (LS-68, LS-54, Aox-27) мікросателітні маркери ДНК, які вперше були ідентифіковані у американського (*Acipenser fulvescens*) [10] та атлантичного (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) осетрів [11].

Метою нашої роботи була оцінка внутрішньовидового генетичного поліморфізму популяції стерляді, яка вирощується в штучних умовах, із застосуванням мікросателітного аналізу ДНК.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень були 36 особин стерляді, від яких на базі басейнового рибного господарства ПП «Біосила» (м. Київ) у листопаді 2013 року прижиттєво були відібрані фрагменти грудних плавців.

Виділення ДНК проводили з використанням набору "ДНК-сорб -В" («Амплі-Сенс», Росія), згідно інструкції виробника.

Для дослідження внутрішньовидового поліморфізму були використані мікросателітні маркери ДНК, представлені в таблиці 1.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили згідно умов, розроблених раніше на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК [12]. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma) та розділяли шляхом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі "ABI Prism 3130" Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми "GeneMapper 3.7" (Applied Biosystems, США) з використанням стандарту S-450 (Синтол, Росія).

Мікросателітні маркери ДНК для генотипування осетрових видів риб

Назва локусу	Тандемні повтори	Розмір (п.н.)	Флуоресцентний барвник	Посилання
LS-19	(TTG)9	112-213	FAM	[9]
LS-68	(GATA)13	104-264	R6G	[9]
LS-39	(GTT)10	90-160	TAMRA	[9]
LS-54	(GATA)6 (GACA)7	130-260	R6G	[9]
Аох-27	(ATTT)5(ATTС) (ATTT)3	110-160	FAM	[10]
Аох-45	(AAT)20	109-170	TAMRA	[10]

Визначення спектру частот ідентифікованих алелів проводили шляхом підрахунку та аналізу отриманих генотипів досліджуваних особин.

Розрахунки показників фактичної (H_o) та теоретичної гетерозиготності (H_e), поліморфізму (PIC) та вірогідності виключення випадкового

збігу алелів (PE) проводили із застосуванням програм Cervus 3.0.3. та PowerStatsV12 (Promega) [13, 14].

Результати та обговорення. В результаті проведеної роботи у досліджуваній популяції стерляді було виявлено 41 алель (табл.2).

Таблиця 2.

Кількість і частота ідентифікованих алелів популяції стерляді

Локус Алель	LS-19	LS-68	LS-39	Аох-27	LS-54	Аох-45
B					0,014	
D	0,556	0,056				
E	0,306					
F	0,097					
G	0,041				0,625	0,027
H				0,070	0,361	0,125
I				0,930		0,111
J						0,111
K						0,097
L			0,028			0,153
M			0,472			0,056
N		0,014	0,472			0,125
O			0,028			0,014
P		0,028				0,111
Q		0,111				0,056
R		0,014				
S		0,083				0,014
T		0,014				
U		0,250				
V		0,138				
W		0,111				
X		0,056				
Y		0,056				
Z		0,014				
Z1		0,027				
Z2		0,014				
Z4		0,014				

З метою підвищення ефективності та зручності сприйняття та оперування даними в роботі з ідентифікації алелів нами була розроблена та застосована власна номенклатура, яка кодує визначені алелі за кожним з досліджуваних мікросателітних маркерів. Алелі, які виходили за межі буквеної номенклатури, позначалися останньою буквою з додаванням цифрової нумерації у порядку зростання.

За локусом LS-19 виявлено 4 алельних варіанти, серед яких найчастіше (0,556) зустрічали алельний варіант D, тоді як алельний варіант G зустрічався найрідше (0,041). Локус LS-68 був найбільш поліморфним і містив 16 алельних ва-

рантів. Найчастіше зустрічався алельний варіант U з частотою 0,250, а найменше - алельні варіанти N, R, T, Z, Z1 та Z4 з однаковою частотою 0,014.

За локусом LS-39 було виявлено 4 алельних варіанти, серед яких варіанти M та N зустрічалися з найбільшою частотою 0,472, тоді як варіанти L та O зустрічалися з однаковою найменшою частотою 0,028.

Локус Аох-27 був найменш поліморфним серед досліджуваних маркерів і складався лише з 2 алельних варіантів H та I з частотою 0,070 та 0,930 відповідно. Серед 3-х виявлених алелів за локусом LS-54 алельний варіант G зустрічався

найчастіше (0,625), тоді як алельний варіант В, навпаки, зустрічався найменше (0,014). За локусом Аох-45 було виявлено 12 алельних варіантів, серед яких найчастіше зустрічався варіант L (0,153), а найменше – варіанти О та S (0,014).

За розрахунками параметрів гетерозиготності було виявлено, що рівень фактичної гетерозиготності (Н_о) коливався від 0,028 для локуса LS-54 до 1,000 для локуса Аох-45. Рівень теоретично

очікуваної гетерозиготності (Н_е) коливався в межах від 0,131 до 0,904 для локусів Аох-27 та Аох-45, відповідно. В середньому фактична гетерозиготність була на рівні 0,454, тоді як середнє значення теоретично очікуваної гетерозиготності було вищим і становило 0,594, що говорить про нестачу гетерозиготних генотипів у досліджуваній популяції стерляді (табл.3).

Таблиця3.

Показники внутрішньовидового поліморфізму популяції стерляді за мікросателітними локусами

Назва локуса	Кількість виявлених алелів	Н _о	Н _е	PIС	PE
LS-19	4	0,389	0,595	0,520	0,107
LS-68	16	0,556	0,887	0,864	0,241
LS-39	4	0,611	0,560	0,452	0,304
Аох-27	2	0,139	0,131	0,121	0,015
LS-54	3	0,028	0,486	0,377	0,001
Аох-45	12	1,000	0,904	0,881	1,000
Середнє	6,83	0,454	0,594	0,536	0,278

Індекс поліморфізму (PIС) для стерляді коливався від 0,121 для локусу Аох-27 до 0,881 для локусу Аох-45.

Таким чином нами було виявлено, що серед досліджуваних мікросателітних маркерів для досліджуваної популяції стерляді локуси Аох-27 та LS-54 є мало інформативним, а локуси LS-68 та Аох-45 є найбільш інформативними. Середнє значення індексу поліморфізму було на рівні 0,536, що говорить про достатній рівень поліморфізму обраних маркерів для даного виду риб (PIС>0,500).

Показник вірогідності виключення випадкового збігу алелів (PE) в середньому становив 0,278. Варто відмітити, що високе значення PE спостерігалися лише для локусу Аох-45 (1,000), це пояснюється тим, що у 100% досліджуваних особин стерляді за даним маркером було виявлено лише гетерозиготні генотипи.

Висновки. Вивчення внутрішньовидового генетичного поліморфізму досліджуваної популяції стерляді вказує на те, що в її генетичній структурі спостерігається наявність низької видової різноманітності і свідчить про негативний вплив штучного відтворення на збереження різноманітності алелофонду цих риб. Серед досліджуваних мікросателітних маркерів найінформативнішим виявилися Аох-45 та LS-68. Для досліджуваної популяції стерляді локуси Аох-27 та LS-54 виявилися мало інформативними, що узгоджується з раніше отриманими даними[6].

Отримані дані можуть бути в подальшому застосовані в роботах зі штучного відтворення для доповнення даної популяції стерляді іншими за генотипами особинами з природних водойм або ж з інших господарств з метою формування пар плідників і збереження видового та популяційного різноманіття.

Список використаної літератури

1. Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J. The threatened status of acipenseriform species: a summary// Sturgeon Biodiversity and Conservation/ Eds V.J.Birstein, W.E.Bemis, J. Waldman. Dordrecht (Netherlands): Kluwer acad. Publ. - 1997. - P.427-435.
2. Chebanov M., Billard R. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption - Aquatic Living Resource - vol.14 - 2001. - P.375–381.
3. Лесюк М.И., Конева О.Ю., Ровба Е.А., Слуквин А.М. Молекулярно-генетические исследования производителей стерляди (*AcipenserRuthenusL*)//Молекулярная и прикладная генетика. – Т.13. – Минск. – 2012. – С.110-117
4. Слуквин А.М., Конева О.Ю., Лесюк М.И. Результаты популяционной идентификации производителей стерляди (*Acipenserruthenus*) ОАО «Рыбхоз»Полесье» (Брестская область, Беларусь), полученные с помощью микросателлитного анализа ДНК// Первая конференция молодых ученых НАСЭЕ. Вопросы аквакультуры// Тезисы докладов. – Тюмень. - 2009. – С.46-47
5. Dudu A., Georgescu S. E.,Burcea A.,Florenca I., Costahe M. Microsatellites Variation in Sterlet Sturgeon, *AcipenserRuthenus* from the Lower Danube// Animal Science and Biotechnologies/ - vol. 46(1). - 2013. – P. 90-94.
6. Dudu A., Suciu R., Parashiv M., Georgescu S. E.,Costahe M., Berrebi P. Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization// Molecular Sciences. - vol. 12. - 2011. – P. 6796-6809.
7. Козлова Н.В., Базелюк Н.Н., Файзулина Д.Р, Стоногина Е.В. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб// Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство

– Астрахань. - №3. – 2013. - С.113-117

8. *Arne Ludwig, Natalia M. Belfiore, Christian Pitra, Victor Svirsky and Ingo Jennecken.* Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*)// *Genetics*. - vol. 158. - 2001. - P.1203–1215

9. *M. Lanfredi¹, L. Congiu¹, M. A. Garrido-Ramos², R. de la Herra, M. Leis¹, M. Chicca¹, R. Rossi¹, J. Tagliavini, C. Ruiz Rejo, M. Ruiz Rejo.* Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species// *Chromosome Research*. - №9 – 2001. - P. 47-52.

10. *May B., Krueger C.C., Kincaid H.L.* - Genetic variability at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*// *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* -vol. 54. - 1997. - P.1542 – 1547

11. *King T.L., Lubinski B.A., Spidle A.P.* – Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross amplification in the *Acipenseridae*// *Conservation Genetics*. – vol. 2. - 2001. - P.103 -119

12. Рєзнікова-Галашевич І.С., Степура В.В., Шельов А.В., Спиридонов В.Г. та ін. Генетична ідентифікація промислових видів риби// *Методичні рекомендації*. – Видавничий центр НУБіП України. – К. – 2011. – 35 с.

13. Айла Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику/ Ф. Айла. - М. – Мир. - 1984. - 232 с.

14. *Marshall T.C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J.M.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations// *Mol. ecol.* – 1998. – P. 639-655.

Мальшева А.А., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*) ЗА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ МАРКЕРАМИ ДНК

Проанализирована внутривидовая генетическая структура популяции стерляди (*Acipenser ruthenus*), которая выращивается в условиях аквакультуры. Исследования проводились по следующим ДНК - маркерам: LS -19, LS -68, LS -39, Aox -27, LS -54 и Aox - 45. В результате наиболее информативными и полиморфными оказались локусы LS -68 и Aox -45, а локусы Aox -27 и LS -54 оказались мало информативными для исследуемой популяции стерляди. На основании проведенных исследований и расчетов наблюдается уменьшение гетерозиготных аллельных вариантов, что может привести к вырождению данной популяции в условиях искусственного рыбозаведения.

Ключевые слова: стерлядь, микросателлитные маркеры ДНК, генетическая структура, полиморфизм, гетерозиготность.

Malyshev A.A., Spiridonov V.G., Melnychuk S.D. POPULATION GENETIC STRUCTURE STURGEON (*ACIPENSER RUTHENUS*) FOR MICROSATELLITE DNA MARKERS

Genetic analysis of Sterlet (*Acipenser ruthenus*) population, which is grown in aquaculture conditions, was carried out using DNA microsatellites markers. We utilize the following DNA markers: LS- 19, LS- 68, LS- 39, Aox- 27, LS- 54 and Aox- 45. As result the most informative loci were found using LS- 68 and Aox- 45 markers. At the same time the next loci Aox- 27 and LS- 54 revealed not informative for analyzed Sterlet population. Based on this research a decrease of heterozygous allelic variants was observed that can lead to degeneration of this population under artificial fish breeding.

Key words: sturgeon, microsatellite DNA markers, genetic structure, polymorphism, heterozygosis.

Дата надходження в редакцію: 11.12.2013 р.

Рецензент: кандидат с.-г. наук, доцент В. В. Вечорка