

ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДНК СЕВРЮГИ (*Acipenser stellatus*, Pallas)

О.О. Малишева, науковий співробітник

В.Г. Спиридонов, доктор сільськогосподарських наук

С.Д. Мельничук, член-кореспондент НААН України

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено внутрішньовидовий поліморфізм севрюги (*Acipenser stellatus*, Pallas), яку отримали від диких плідників чорноморської популяції та вирощують в умовах аквакультури. За досліджуваними ДНК-маркерами (LS-19, LS-39, Аох-27, LS-54) встановлено, що найінформативнішим та поліморфним виявився локус LS-54, тоді як LS-39 — мономорфним. На підставі проведених за показниками поліморфізму досліджень і розрахунків встановлено збереження видової різноманітності генотипів севрюги.

Вступ. Представники родини осетрових (*Acipenseridae*), однієї з найдавніших груп хрящових риб, пережили більш ніж 350 млн років еволюції, пристосовуючись до різних екологічних умов існування [1]. Однак посилення антропогенного тиску на природні екосистеми, надмірний неконтрольований вилов, браконьєрство, забруднення річок та будівництво гребель негативно вплинули на стан популяцій риб. У наслідку — втрата нерестовищ та масштабне зниження світових запасів осетрових до межі зникнення [2, 3].

На сьогодні задля збереження природних біоресурсів альтернативою підтримання популяцій осетрових виступає їх штучне відтворення та формування маточних стад плідників в умовах риборозплідних заводів, які поповнюють отриманою молоддю природні водойми [4]. При цьому обов'язковою вимогою має бути дотримання умови збереження генетичного різноманіття цих видів риб.

Представником родини осетрових є севрюга (*Acipenser stellatus*, Pallas), котра

відіграє вагомую роль в біорізноманітті Азово-Чорноморського басейну і до недавнього часу була важливим об'єктом промислу [4,5]. Однак через надмірний вилов та браконьєрство відбулося значне зниження запасів даного виду. У зв'язку з цим від квітня 1998 р. торгівля та вилов севрюги регулюється Конвенцією про міжнародну торгівлю зникаючими видами флори і фауни СІТЕС [6,7].

Слід зазначити, що незважаючи на комерційну й екологічну важливість, інформація щодо генетичного стану популяції севрюги та її різноманітності в Азово-Чорноморському басейні є недостатньою.

Сучасне вивчення видового різноманіття, разом з морфологічними дослідженнями, передбачає використання молекулярно-генетичних методів із застосуванням мікросателітних маркерів ДНК [8,9].

Мікросателіти — це високополіморфні короткі послідовності ДНК, які розподілені по геному і є потужним інструментом у багатьох напрямках досліджень

з популяційної генетики та розведення риб [10,11]. Ці маркери успішно застосовують для таксономії, ідентифікації походження, програм розведення промислових риб, тощо [12,13]. Перевагою мікросателітного аналізу є й те, що зразки отримують прижиттєво шляхом відбору фрагментів плавців, луски, крові та ікри, що є важливою умовою роботи зі зникаючими видами. Саме тому останніми роками мікросателітні маркери, як один з надійних методів молекулярно-генетичного аналізу, застосовують для багатьох видів риб, зокрема осетрових [14,15]. Розуміння генетичної різноманітності популяції севрюги може лягти в основу розробки систем управління структурою популяції і відновлення її запасів в умовах посиленого антропогенного тиску на природні водойми [16,17,18,19].

Метою нашого дослідження був аналіз генетичного різноманіття вирощуваної в аквакультури популяції севрюги методом мікросателітного аналізу ДНК.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень слугувала вибірка із 32 особин ремонтно-маточного стада севрюги зі ставів Дніпровського виробничо-експериментального осетрового рибозводного заводу. В господарстві цю групу риб було отримано від диких плідників севрюги чорноморської популяції для подальшого штучного відтворення та поповнення природного ареалу мешкання.

Відбір зразків для досліджень проводили прижиттєво під час осіннього бонітування 2013 р. Біоптат грудних плавців вміщували в окремі стерильні пробірки, маркували та фіксували 96% етанолом. Виділення ДНК проводили з використанням набору "ДНК-сорб-В" ("Амплі-Сенс", Росія), згідно з інструкцією виробника.

Для молекулярно-генетичних досліджень популяції використовували чотири мікросателітні маркери ДНК – LS-19, LS-39, LS-54 і Аох-27, які знаходяться в міжнародній генетичній базі даних GenBank (табл. 1).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили згідно оптимізованих умов, розроблених раніше на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК [22].

Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma) і розділяли шляхом електрофорезу на 4-капілярному генетичному аналізаторі "ABI Prism 3130" Genetic Analyser (*Applied Biosystems*, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми "Gene Mapper 3.7" (*Applied Biosystems*, США) з використанням стандарту S-450 (Синтол, Росія).

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

Таблиця 1. Мікросателітні маркери ДНК для генотипування осетрових видів риб

Назва локусу	Тандемні повтори	Розмір (п.н.)	Флуоресцентний Барвник	Номер GenBank	Посилання
LS-19	(TTG)9	112-213	FAM	U72730	[20]
LS-39	(GTT)10	90-160	TAMRA	U72734	[20]
LS-54	(GATA)6 (GACA)7	130-260	R6G	U72735	[20]
Аох-27	(ATTT)5 (ATTC) (ATTT)3	110-160	FAM	AF067812	[21]



Розрахунки показників фактичної (Ho) та теоретичної гетерозиготності (He), поліморфізму (PIC) та вірогідності виключення випадкового збігу алелів (PE) проводили із застосуванням програм Cervus 3. 0.3. та Power Stats V12 (Pro-mega) [23, 24].

Результати та обговорення. В досліджуваній популяції севрюги нами було виявлено 21 алель (табл. 2). У роботі з ідентифікації алелів розроблено і застосовано власну номенклатуру з використанням літер латинського алфавіту.

Така номенклатура кодує визначені алелі за кожним із досліджуваних мікросателітних маркерів ДНК і надає зручності у сприйнятті та оперуванні даними.

За локусом LS-19 було виявлено 5 алельних варіантів, серед яких варіант E зустрічався найчастіше (0,437), а С – найрідше (0,031).

Локус LS-39 виявився мономорфним – має лише один алельний варіант J, що є типовим для даного виду риб за цим мікросателітним маркером і узгоджується з дослідженнями закордонних авторів [5,15–19].

За локусом Aox-27 виявлено 6 алельних варіантів, серед яких M зустрічався найчастіше (0,250), а H – найрідше (0,016).

Локус LS-54 налічував 9 алельних варіантів; G та K зустрічалися найчастіше з однаковою частотою (0,188), тоді як H та N – найменше (0,031).

Середня кількість алельних варіантів за чотирма мікросателітними маркерами ДНК (LS-19, LS-39, LS-54 та Aox-27) для популяції севрюги знаходилася на рівні 5,25 (табл. 3).

За розрахунками параметрів гетерозиготності було виявлено, що рівень фактичної гетерозиготності (Ho) коливався від 0,875 для локусу LS-19 до 1,000 для LS-54.

Рівень теоретично очікуваної гетерозиготності (He) коливався в межах від 0,704 до 0,872 для локусів LS-19 та LS-54, відповідно. В середньому фактична гетерозиготність була на рівні 0,938, тоді як середнє значення її теоретично очікуваної виявилось нижчим і становило 0,790, що засвідчує надлишок гетерозиготних ге-

Таблиця 2. Кількість і частота ідентифікованих алелів популяції севрюги

Локус Алель	LS-19	LS-39	Aox-27	LS-54
A				
B				
C	0,031			
D	0,063			
E	0,437			0,141
F	0,219			0,062
G	0,250			0,188
H			0,016	0,031
I				
J		1,000		0,078
K			0,234	0,188
L				0,141
M			0,250	0,141
N			0,203	0,031
O			0,234	
P			0,063	
Q				

Таблиця 3. Показники внутрішньовидового поліморфізму популяції севрюги за мікросателітними локусами

Назва локуса	Кількість виявлених алелів	Но	Не	PIC	PE
LS-19	5	0,875	0,704	0,642	0,745
LS-39	1				
Аох-27	6	0,938	0,795	0,746	0,872
LS-54	9	1,000	0,872	0,842	1,000
Середнє	5,25	0,938	0,790	0,743	0,872

нотипів й пов'язане з використанням у роботах з відтворення диких плідників севрюги чорноморської популяції.

Індекс поліморфізму (PIC) для севрюги коливався від 0,642 для локусу LS-19 до 0,842 для LS-54. Середнє значення індексу поліморфізму становило 0,743, що підтверджує достатній рівень поліморфізму обраних маркерів для даного виду риб (PIC>0,500).

Показник вірогідності виключення випадкового збігу алелів (PE) в середньому дорівнював 0,872, що засвідчує високу інформативність за даними мікросателітними маркерами.

Таким чином, у популяції севрюги прослідковується збереження гетерозиготних генотипів, що на даному етапі підтверджує достатню видову різноманітність алофонду риб.

Найінформативнішим виявився локус LS-54, тоді як LS-39 був мономорфним, що узгоджується з раніше отриманими даними для інших популяцій севрюги.

Висновки

Молекулярно-генетичні дослідження чорноморської популяції севрюги показують, що в генетичній структурі зберігається висока видова різноманітність. Найінформативнішим серед досліджуваних мікросателітних маркерів є LS-54, а LS-39 – мономорфний.

Отримані дані можуть застосовуватись для моніторингу генетичного стану популяції севрюги, а також для розробки комплексу заходів з підвищення ефективності селективного розведення і збереження структури та видового різноманіття цього виду риб.

Література

1. Bemis, W.E., Kynard, B. Sturgeon rivers: an introduction to Acipenseriformes biogeography and life history // Sturgeon Biodiversity and Conservation / Eds V.J. Birstein, J.R. Waldman and W.E. Bemis). – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997 – P. 167–183.
2. Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches // Sturgeon Biodiversity and Conservation. - Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. –1997. – P. 127–155.
3. 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: Kluwer Acad. Publ. – 1997. – P. 427–435.
4. Стан запасів осетрових риб та розвиток осетрової аквакультури в Україні / Третяк О.М., Ганкевич Б.О., Колос О.М., Яковлева Т.В. // Рибогосподарська наука України. – 2010. – №4. – С.4–22.
5. Microsatellites DNA variation in the Black Sea stellate sturgeon, *Acipenser stellatus* / Dudu, A., S. E. Georgescu, et al. // Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehнологii. – 2008. – 4. – P. 78–82.
6. Raymakers C. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // J. Appl. Ichthyol. – 2006. – 22, Suppl. 1. – P. 53–65.
7. Raymakers C., Hoover S. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries // J. Appl. Ichthyol. – 2002. – 18, №4–6. –P. 629–638.



8. Chistiakov D.A, Helleman B. Microsatellites and their genomic distribution evolution function and applications: A review with special reference to fish genetics // Review. Aquacul. – AQUA–626814. – 2005. – P. 29.
9. Ludwig A. Identification of Acipenseriformes species in trade // J. Appl. Ichthyol. – 2008. – 24, Suppl. 1. – P. 2–19.
10. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб / Козлова Н.В., Базелюк Н.Н., Файзулина Д.Р, Стоногина Е.В. // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2013. – №3. – С. 113–117.
11. Henderson A. A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol. Ecology Notes. – 2002. – 2. – P. 437–439.
12. Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) Ludwig A., Belfiore N., Pitra C. et al. // Genetics. – 2001. – 158. – P. 1203–1215.
13. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphyrhynchus* and *Acipenser* / McQuown E.C., B.L. Sloor, R.J. Sheehen, B. May // Am.Fish.Soc. – 2000. – 129. – P.1380–1388.
14. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species / M. Lanfredi1, L. Congiu1, M.A. Garrido-Ramos et al. // Chromosome Reseach. – 2001. – №9. – P. 47–52.
15. Nuklear Markers of Danube Sturgeons Hibridization / Dudu A., Suci R., Parashiv M. et al. // Meclular Sciences. – 12. – 2011. – P. 6796–6809.
16. Holostenco D.N. Conservation of genetic diversity in populations of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) of the NW Black Sea and Lower Danube River. – Marine Coastal Development // Norwegian University of Science and Technology. – 2011. – 58 p.
17. A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus* / Jenneken J.-N., Meyer G., Horstgen-Schwark B. et al. // J. Appl. Ichthyol. – 2001. – 17. – P. 39–42.
18. Norouzi M., Pourkazemi M. Genetic structure of Caspian populations of stellate sturgeon, *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771), using microsatellite markers // International Aquatic Research. – 2009 – 1. – P. 61–65.
19. Populacion genetic structure of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) in the south Caspian sea using microsatellite markers / Norouzi M., Pourkazemi M., Keyvan A. et al. // J. of Fisheries and Aquatic Science. – 2008. – 3. – P.158–166.
20. 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. AquatSci. – 1997. – 54. – P.1542–1547.
21. King T.L., Lubinski B.A., Spidle A.P. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and crossamplification in the *Acipenseridae* // Conservation Genetics. – 2001. – 2. – P. 103–119.
22. Спиридонов В.Г. Генетична ідентифікація промислових видів риби: Методичні рекомендації / Резникова-Галашевич І.С., Степура В.В., Шельов А.В. та ін. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2011. – 35 с.
23. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment / S.T. Kalinowski, M.L. Taper, T.C. Marshall // Molecular Ecology. – 2007. – 16, №5. – P. 1099–1106.
24. Айла Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 232 с.

АННОТАЦІЯ

*Малишева О.А., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. Поліморфізм мікросателітних маркерів ДНК себрюги (*Acipenser stellatus*, Pallas) // Біоресурси і природопольовання. – 2014. – 6, № 3–4. – С. 11–15.*

*Вивчено внутривидовий поліморфізм себрюги (*Acipenser stellatus*, Pallas), котрою отримали від диких виробників чорноморської популяції і вирощують в умовах аквакультури. По досліджуваним ДНК-маркерам (LS-19, LS-39, Aox-27, LS-54) встановлено, що локус LS-54 являється найбільш інформативним і поліморфним, тоді як LS-39 – мономорфним. На основі досліджень і розрахунків встановлено збереження видового різноманіття генотипів себрюги.*

SUMMARY

*O. Malysheva, V. Spirydonov, S. Melnychuk. Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*, Pallas) microsatellite DNA markers polymorphism // Biological Resources and Nature Management. – 2014. – 6, № 3–4. – P. 11–15.*

*Intraspecific DNA polymorphism of stellate (*Acipenser stellatus*, Pallas) from Black Sea population of will spawners was investigated. From DNA markers studied (LS-19, LS-39, Aox-27, LS-54) LS-54 was found the most polymorphic, whereas LS-39 was proved to be monomorphic. Based on these studies and calculations in terms of polymorphism it was observed preservation of species diversity of stellate genotypes.*