

8. Копилов К.В. Генетична структура різних порід великої рогатої худоби за локусами кількісних ознак у тварин / К.В.Копилов // Розведення і генетика тварин. Міжвід. темат. наук. зб. – К.: Аграрна наука. - 2010. – Вип. 44. – С. 91-95.

9. Петренко І.П., Зубець М.В., Винничук Д.Т. Структура генофонда породи по аддитивному генетичному потенціалу продуктивності // Вісник аграрної науки.- 1995. - №1. – С. 73-91.

10. Петренко І.П., Зубець М.В., Винничук Д.Т., Петренко А.П. Генетико-популяційні процеси при розведенні тварин. – К.: Аграрна наука, 1997. – 473 с.

Проведен теоретический анализ вероятностного образования генетического разнообразия гамет у быков и коров по аддитивному генетическому потенциалу активности (А.Г.П.А.) хромосом при разных уровнях консолидации их наследственности.

The theoretic analysis of probable formation of genetic variability of bulls' and cows' gametes an additive genetic potential of activity (A.G.P.A.) at different levels of heredity consolidation is conducted

Дата надходження в редакцію: 7.11.2012 р.

Рецензент: д.с.г.н., професор Л.М.Хмельничий

УДК 575.22:597.442

STR-АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ АЗОВСЬКОЇ СЕВРЮГИ

О.В. Дубін, к.с.-г.н., Білоцерківський національний аграрний університет

Л.В. Шостак, Білоцерківський національний аграрний університет

Т.М. Димань, д.с.-г.н., Білоцерківський національний аграрний університет

Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм азовської севрюги за сімома мікросателітними локусами: AfuG34, AfuG41, AfuG51, AfuG54, An20, AoxD161 та AoxD165. За всіма дослідженими STR-локусами виявлено поліморфізм. На підставі розрахунку алельних частот визначено основні показники генетичної мінливості досліджених риб. Середнє число алелей на локус становило 8,143, ефективне число алелей – 5,345, середня наявна та середня очікувана гетерозиготність дорівнювали 0,765 і 0,788 відповідно.

Ключові слова: севрюга, молекулярно-генетичний поліморфізм, STR-маркери, гетерозиготність.

Збереження та відтворення зникаючих видів неможливе без оцінювання їх генетичної різноманітності. Севрюга, колись поширений та важливий промисловий вид іхтіофауни Азовського моря, нині не тільки втратила своє промислове значення, але й перебуває на межі повного зникнення. Недостатність інформації щодо генетичної характеристики популяції азовської севрюги значно ускладнює її штучне розведення. Особливого значення дослідження генетичного поліморфізму набуває у зв'язку з формуванням ремонтно-маточних стад севрюги, без створення яких неможливе ефективне відтворення цього виду як для поповнення природних популяцій, так і для товарного вирощування.

Важливе значення для максимально ефективного використання обмеженої кількості плідників азовської севрюги має пошук інформативних маркерів для оцінювання їх генетичної різноманітності та підтвердження належності особин до тієї чи іншої популяції в межах одного виду. Застосування в рибництві новітніх наукових розробок, зокрема тих, що базуються на дослідженні ДНК, уможливить вирішення низки практичних завдань – проведення генетичної паспортизації плідників та моніторингу популяційного різноманіття, виявлення видоспецифічних маркерів як

для живих риб, так і продуктів їх переробки, вивчення внутрішньовидової структури природних та штучних популяцій тощо.

Молекулярно-генетичні методи дослідження геномів останнім часом набули широкого розповсюдження у всіх галузях вітчизняного сільського господарства. Нині найбільш ефективними та достовірними для вивчення генетичного поліморфізму є молекулярно-біологічні методи за використання полімеразної ланцюгової реакції.

Метою роботи було дослідження генетичного поліморфізму ядерної ДНК севрюги азовської популяції за сімома мікросателітними локусами.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень слугували зафіксовані у етанолі плавці севрюги. 34 зразки було відібрано зажиттєво впродовж 2007–2008 рр. у акваторії Азовського моря. Всі використані у роботі генетичні матеріали належать Лабораторії генетичних досліджень ДП НАМ (м. Бердянськ). Виділення геномної ДНК проводили за методикою сорбції ДНК на силіцій оксиді [1] з власними модифікаціями.

ПЛР проводили на ампліфікаторі "Терцик" за таким температурним режимом: початкова денатурація – 4 хв за 94 °С; 36 циклів: 20 с за 94°С, 20 с за 58–61°С (залежно від локусу), 20 с за 72°С; термінальна елонгація – 5 хв за 72 °С. Реакційна

суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 30–70 нг геномної ДНК, 1,5–2,0 мМ MgCl₂ та 0,2–0,4 мкМ праймерів. У роботі було використано 7 мікросателітних локусів, розроблених для *A. fulvescens* [2], *A. nassarii* [3], та *A. oxyrinchus* [4]. Нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Нуклеотидні послідовності використаних праймерів

Локус	Повтор	Послідовність праймерів, 5→3
AfuG 34	(ATAG) n	F...AGGTCAGGGGCTCAACACA R...CGTATTCATCCCAGCATCCA
AfuG 41	(GATA) n	F...TGACGCACAGTAGTATTATTTATG R...GATGTTTGCTGAGGCTTTTC
AfuG 51	(ACAA) n	F...TAATAATGAGCGTGCTTTCTG R...ATTCCGCTTGCGACTTATT
AfuG 54	(TGTT) n	F...CCGTTTTATAGTGTGGTCA R...CTGGCAGATTTGGTTATTTA
An 20	(ATCT) n	F...AACAAATCATTACATGAGGCTGT R...GGATGTTATGACATTCTATGGTC
AoxD 161	(CTAT) n	F...TGAAATGATTGAGAAAATGC R...GACAGACACTCTAGTTAAACAGC
AoxD 165	(TATC) n	F...TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC R...AAAGCCCTACAACAAATGTCAC

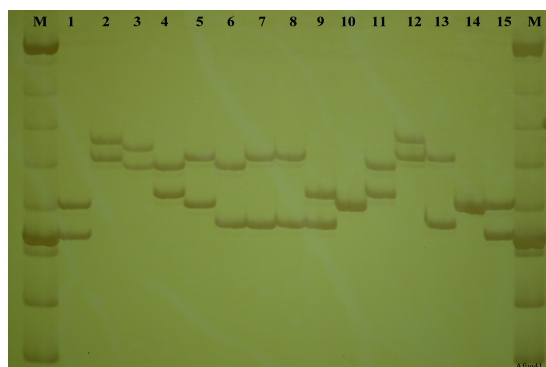
Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 12 % нативному поліакриламідному гелі (ПААГ) за використання 0,5×ТВЕ-

буферу. Після закінчення електрофорезу гелі фарбували нітратом срібла [5] та фотографували цифровою фотокамерою. Молекулярну масу алелей визначали за маркером GeneRuler 50 bp (Fermentas, Литва) за використання програмного пакету Quantity One® Version 4.6.3 (BioRad, США).

Математичну обробку результатів проводили за використання програми PopGen 32 [6] та спеціалізованого макроса GenAlEx6 для MS EXCEL [7]. Як показники генетичного різноманіття визначали: n_a – загальну та n_e – ефективну кількість алелів на локус, H_e – очікувану та H_o – наявну гетерозиготність, I – індекс гетерогенності Шеннона, F – індекс фіксації Райта.

Результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження генетичного різноманіття азовської популяції севрюги, проводили за аналізу ядерної ДНК на основі поліморфізму семи мікросателітних локусів з тетра-нуклеотидними повторами корових мотивів: AfuG34, AfuG41, AfuG51, AfuG54, An20, AoxD161 та AoxD165. Оскільки обрані локуси спочатку розроблялись для інших видів родини *Acipenseridae*, для отримання чітких та відтворних алелей нами підібрано оптимальні умови проведення ПЛР для кожного локусу окремо. Приклади отриманих STR-спектрів севрюг наведено на рисунку 1.



а



б

Рис.1. STR-аналіз генетичного поліморфізму севрюги за локусами AfuG41 (а) та AfuG34 (б): М – маркер молекулярної маси, 1-15 – досліджені риби

Сумарно за використання семи STR-локусів у досліджених особин виявлено 57 алелів, молекулярна маса яких становила 110–304 п.н. (табл. 2). За всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами виявлено поліморфізм. Найбільшу кількість алелів для цього типу маркерів було отримано за ампліфікації двох локусів AfuG34 та AfuG41 (11 алелей), найменшу для локусу AfuG54 (5 алелей). Ефективна кількість алелей на локус у досліджених севрюг Азовського моря знаходилася в межах від 2,592 (An20) до 7,605 (AfuG34).

На підставі розрахунку алельних частот визначено основні показники генетичної мінливості. Найвищий рівень наявної гетерозиготності зафік-

совано для локусів AfuG34, AfuG41, AoxD161 та AoxD165 (82,4%), найнижчий для локусу AfuG51 (64,7%). Значення наявної гетерозиготності за мікросателітними локусами AoxD161, AfuG34, AfuG41 та AoxD165 були близькими до очікуваного, локус An20 характеризувався надлишком гетерозигот, а для локусів AfuG51 та AfuG54 було виявлено їх дефіцит.

Таблиця 2 – Значення показників генетичного різноманіття досліджених риб

Локус	Розмір, п.н.	n_a	n_e	H_o	H_e	F
AfuG34	124-176	11	7,605	0,824	0,869	0,052
AfuG41	196-236	11	7,316	0,824	0,863	0,046
AfuG51	284-304	7	3,932	0,647	0,746	0,132
AfuG54	268-284	5	4,699	0,706	0,787	0,103
An20	144-166	6	2,592	0,706	0,614	-0,149
AoxD161	110-134	7	4,777	0,824	0,791	-0,042
AoxD165	152-196	10	6,494	0,824	0,846	0,027
Mean	-	8,143	5,345	0,765	0,788	0,024

Встановлено, що значення інформаційного індексу Шеннона (I) знаходилися в межах від 1,300 до 2,193. Найменше значення індексу I було зафіксовано за локусом An20, найбільше – AfuG34. Розрахунок індексу інбридингу F , що відображає інбридинг особини відносно популяції, показав наявність надлишку гетерозигот за локусами An20 ($F = -0.149$) та AoxD161 ($F = -0.042$).

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отже, оцінка основних параметрів генетичної різноманітності, виконана на основі по-

ліморфізму 7-ми розглянутих мікросателітних локусів показала, що азовська севрюга характеризується високим рівнем генетичної мінливості. У поліморфному стані перебуває 100% проаналізованих локусів. Середнє значення індексу фіксації (F) становило 0,024. Однак, за окремими локусами спостерігався дефіцит гетерозигот, що можна пояснити обмеженою кількістю плідників, потомство яких використовують для зариблення Азовського басейну.

Впровадження в рибогосподарську практику аналізу поліморфізму мікросателітних локусів дасть змогу визначати популяційну належність окремих особин всередині виду для планування та проведення робіт з реінтродукції зникаючих видів в нативні ареали існування з метою відновлення чисельності популяцій. Дослідження генетичної різноманітності ремонтно-маточних стад, потомство яких використовують для зариблення природних водойм, дасть змогу уникнути інбридної депресії, яка впливає на відтворення та призводить до скорочення поголів'я.

Список використаної літератури:

1. Carter M. J., Milton I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M. J. Carter, I. D. Milton // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol.21. – P.1044–1046.
2. Welsh A.B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* / A.B. Welsh, M. Blumberg, B. May // *Mol. Ecol. Notes* – 2003. – Vol.3, №1. – P.47–55.
3. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) / L. Zane, T. Patarnello, A. Ludwig et al. // *Mol. Ecol. Notes*. – 2002. – Vol. 2, № 4. – P.586–588.
4. Henderson-Arzapalo A.P. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management / A.P. Henderson-Arzapalo, T.L. King // *Mol. Ecol. Notes*. – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 437–439.
5. Y.C. Han. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels / Han Y.C., Teng C.Z., Hu Z.L., Song Y.C. // *Electrophoresis*. – 2008. – Vol. 29. – P. 1355–1358.
6. Yeh F.C. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / F.C. Yeh, T.J.B. Boyle // *Belgian J. Botany*. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.
7. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. – P.288–295.

Исследован молекулярно-генетический полиморфизм азовской севрюги по семи микросателлитным локусам: AfuG34, AfuG41, AfuG51, AfuG54, An20, AoxD161 и AoxD165. По всем исследованным STR-локусам обнаружен полиморфизм. На основании расчета аллельных частот определены основные показатели генетической изменчивости исследованных рыб. Среднее число аллелей на локус составило 8,143, эффективное число аллелей – 5,345, средняя наблюдаемая и средняя ожидаемая гетерозиготность составили 0,765 и 0,788 соответственно.

Ключевые слова: севрюга, молекулярно-генетический полиморфизм, STR-маркеры, гетерозиготность.

The molecular-genetic polymorphism of Azov stellate sturgeon was investigated for seven microsatellite loci: AfuG34, AfuG41, AfuG51, AfuG54, An20, AoxD161 and AoxD165. All investigated STR-loci revealed polymorphism. Based on the calculation of allele frequencies the main indices of the genetic variability for studied fishes were identified. The average number of alleles per locus was 8.143, the effective number of alleles – 5.345, the average observed and average expected heterozygosity were 0.765 and 0.788 respectively.

Key words: stellate sturgeon, molecular-genetic polymorphism, STR-markers, heterozygosity.

Дата надходження в редакцію: 8.11.2012 р.

Рецензент: д.с.г.н., професор Л.М.Хмельничий