

## АМПЛІФІКАЦІЯ МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ЯК МЕТОД ОЦІНЮВАННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ПОПУЛЯЦІЇ АЗОВСЬКОЇ СЕВРЮГИ

Підібрано оптимальні умови проведення ISSR-PCR для 10 праймерів і отримано інформативні спектри ампліфікації з ДНК севрюги. Загалом отримано 137 продуктів ампліфікації, 96 (70 %) з яких були поліморфними у досліджених риб. Охарактеризовано ДНК-патерни севрюг Азовського моря та визначено генетичні дистанції між ними. На підставі розрахунку частот розподілу ПЛР-локусів визначено основні показники генетичної мінливості досліджених риб.

### Постановка проблеми

Севрюга (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) – унікальний представник родини Acipenseridae, що мешкає у Азовському, Чорному та Каспійському морях. До будівництва гідроспоруд в 50-х роках минулого століття, що призвело до втрати основних нерестовищ, азовська севрюга була найчисленнішим видом осетрових Азовського моря [1]. Наразі, внаслідок негативного антропогенного впливу на екосистему Азовського басейну в цілому, неконтрольованого браконьєрського вилову та відсутності координованої державної політики щодо штучного відтворення, севрюга не тільки втратила промислове значення, але і знаходиться на межі повного зникнення. Тому севрюгу, як і інші види осетрових, включено одразу до двох міжнародних конвенцій (Боннської та СІТЕС) та Червоної книги України.

Багаторічними дослідженнями доведено, що азовська севрюга значно відрізняється за комплексом фізіологічних показників (швидкість росту, вік дозрівання та ін.) від інших популяцій цього виду. Це означає, що в азовському басейні сформувалася аборигенна популяція севрюги з унікальним генофондом. Саме тому, спроби інтродукції каспійської севрюги в колишньому СРСР виявилися неефективними та були припинені [2].

### Аналіз останніх наукових досліджень та постановка завдання

Використання молекулярно-біологічних методів аналізу генетичного поліморфізму для збереження рідкісних та зникаючих видів останнім часом приділяється все більше уваги. У порівнянні з іншими видами осетрових популяційна структура та генетичний поліморфізм севрюги за ДНК-маркерами вивчені недостатньо. Особливого значення оцінювання рівня генетичної мінливості як окремих особин, так і популяції в цілому набуває у зв'язку зі створенням ремонтно-маточних стад. Використання для зариблення водойм потомства обмеженої кількості плідників призводить до значного поширення

одних генотипів та зникнення інших, що зумовлює необхідність проведення моніторингу генетичних процесів у популяціях зникаючих видів [3]. Саме тому, завданням даної роботи був пошук інформативних ISSR-маркерів для оцінювання генетичної різноманітності популяції севрюги Азовського моря.

### Об'єкти та методика досліджень

Матеріалом для досліджень слугували зафіксовані в етанолі плавці севрюги, 42 зразки яких було відібрано зажиттєво впродовж 2007–2009 рр. у акваторії Азовського моря. Виділення геномної ДНК проводили за методикою сорбції ДНК на силіцій оксиді [4] з власними модифікаціями. ПЛР проводили за раніше описаними умовами [5].

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2 %-ному агарозному гелі за використання 1×TBE-буферу. Після завершення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), і фотографували ПЛР-продукти за допомогою відеосистеми GelDoc XR System за використання програмного пакету Quantity One (BioRad, США). Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas, Литва).

Комп'ютерний аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму ДНК проводили за використання спеціалізованого макроса GenAlEx6 для MS EXCEL [6].

### Результати досліджень

Незважаючи на тривалий термін застосування ISSR-маркерів для вирішення теоретичних та практичних завдань генетики тварин, для аналізу геному осетрових видів риб дана методологія не розроблена. Тому, з метою підбору інформативних маркерів, ми провели скринінг 36 ISSR-праймерів та відібрали 10, що дозволяють отримувати чіткі й поліморфні спектри ампліфікації з ДНК севрюги (рис.1).

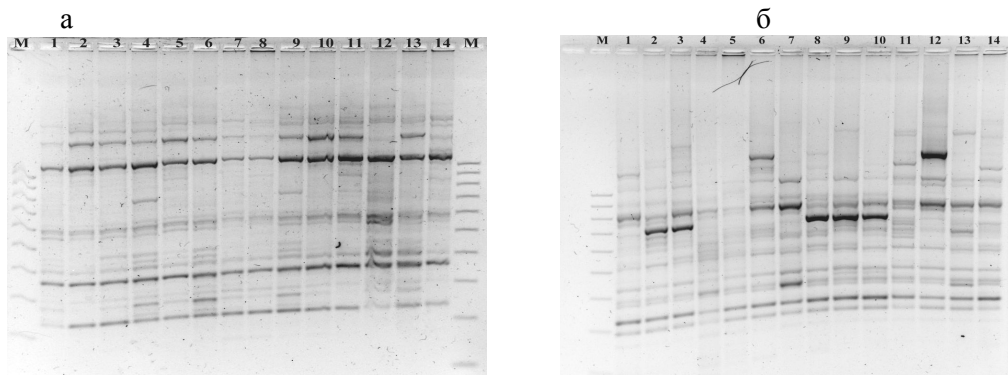


Рис.1. ISSR-спектри севрюги за використання праймерів  $(GTG)_6A$  (а) та  $(CTC)_6C$  (б): М – маркер молекулярної маси, 1-14 – досліджені зразки севрюги

Статистичну обробку отриманих ПЛР-патернів проводили за допомогою порівняльного аналізу смуг у спектрах досліджуваних зразків. При цьому, враховували тільки відтворні у повторних експериментах фрагменти, а кожну смугу на електрофореграмі розглядали як окремий генетичний локус. За кожним праймером було складено бінарні матриці, в яких наявність смуги певної молекулярної маси у спектрах риб позначали 1, відсутність – 0.

Загалом, за використання 10 ISSR-праймерів було отримано 137 продуктів ампліфікації з ДНК севрюг, 96 (70 %) з яких були поліморфними у досліджених риб (табл. 1). Найбільшу загальну (24) та поліморфну кількість локусів (18) для цього типу генетичних маркерів спостерігали за ампліфікації з праймером (ACC)<sub>6</sub>G, найменшу – з динуклеотидним праймером (GA)<sub>8</sub>T – 10 та 6, відповідно. Рівень поліморфізму застосованих ISSR-праймерів був достатньо високим та складав 60 – 82 %.

Таблиця 1. Загальна характеристика ISSR-спектрів севрюги

Праймер	Загальна кількість локусів	Кількість поліморфних локусів	Рівень поліморфізму
(AG) <sub>8</sub> (Y)G	14	10	0,71
(AC) <sub>8</sub> G	12	8	0,67
(GA) <sub>8</sub> C	15	11	0,73
(GA) <sub>8</sub> T	10	6	0,60
(GA) <sub>8</sub> YT	12	8	0,67
(ACC) <sub>6</sub> G	24	18	0,75
(CTC) <sub>6</sub> C	11	9	0,82
(GAG) <sub>6</sub> G	14	8	0,57
(GTG) <sub>6</sub> A	12	9	0,75
(AGC) <sub>6</sub> C	13	9	0,69

Молекулярна маса продуктів ампліфікації варіювала від 160 п.н. до 2100 п.н. залежно від праймера. У ПЛР-спектрах севрюг переважали амплікони зі середньою молекулярною масою 500–1500 п.н., їх частка складала 74,16 %. Найменшу частку становили високомолекулярні продукти ампліфікації – 4,28 %. Амплікони з молекулярною масою < 500 п.н. складали 21,56 % від загальної кількості продуктів ПЛР.

За частотою розподілу ампліконів ISSR-спектри досліджених риб мали такі характеристики: частка ампліконів, що зустрічалися з низькою частотою ( $\geq 0,2$ ) складала 22,75 %, з середньою частотою ( $\geq 0,5$ ) – 32,42 %, з високою ( $\geq 0,99$ ) – 15,83 %. 39 ПЛР-локусів (29 %) були спільними у спектрах всіх риб.

Отримані бінарні матриці використовували для визначення основних показників генетичної мінливості досліджених риб: середньої ( $n_a$ ) та ефективної кількості алелів на локус ( $n_e$ ), очікуваної гетерозиготності ( $H_e$ ) та індексу гетерогенності Шеннона ( $I$ ) (табл. 3).

Таблиця 3. Показники генетичної мінливості севрюги, розраховані за поліморфізмом ISSR-маркерів

Праймер	$n_a$	$n_e$	$I$	$H_e$
(AG) <sub>8</sub> (Y)G	1,812	1,342	0,387	0,361
(AC) <sub>8</sub> G	1,734	1,353	0,344	0,334
(GA) <sub>8</sub> C	1,722	1,226	0,286	0,267
(GA) <sub>8</sub> T	1,698	1,374	0,312	0,298
(GA) <sub>8</sub> YT	1,789	1,293	0,298	0,269
(ACC) <sub>6</sub> G	1,844	1,282	0,332	0,224
(CTC) <sub>6</sub> C	1,756	1,233	0,294	0,236
(GAG) <sub>6</sub> G	1,664	1,378	0,331	0,316
(GTG) <sub>6</sub> A	1,732	1,343	0,318	0,348
(AGC) <sub>6</sub> C	1,778	1,402	0,366	0,286
Σср	1,753	1,323	0,327	0,294

Середні значення генетичних показників, розраховані за поліморфізмом ISSR-спектрів севрюги, становили: число алелей на праймер – 1,753, ефективне число алелей – 1,323, очікувана гетерозиготність та індекс гетерогенності Шеннона – 0,294 і 0,327, відповідно.

Аналіз генетичних взаємовідносин між дослідженими рибами проводили за використання індексів генетичної ідентичності та генетичних відстаней [7]. Розраховані генетичні дистанції були порівняно невеликими, але достатніми для дискримінації досліджених генотипів. Середні значення генетичних дистанцій ( $D_m$ ) між особинами севрюги становили –  $0,0352 \pm 0,018$ .

### Висновки та перспективи подальших досліджень

У результаті проведеної роботи нами було визначено поліморфні та інформативні ISSR-маркери та підбрано оптимальні умови проведення ПЛР для аналізу геному севрюги. Оцінка основних параметрів генетичної різноманітності азовської севрюги, виконана за поліморфізмом ISSR-маркерів, показала, риби які досліджувалися характеризується високим рівнем генетичної мінливості. Отримані молекулярні маркери уможливають підбір генетично віддалених пар плідників для штучного відтворення та дозволять проводити моніторинг генетичних процесів у популяції севрюги.

### Література

1. Сабодаш В.М., Демьяненко К.В. Некоторые экологические закономерности распределения русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* и севрюги *Acipenser stellatus* в Азовском море / В.М. Сабодаш, К.В. Демьяненко // Гидробиол. журн. – 1997. – Т. 33, № 1. – С. 14–24.

2. *Цветненко Ю.Б.* Эффективность и генетические последствия интродукции севрюги *Acipenser stellatus* из Каспийского в Азовский бассейн / *Ю.Б. Цветненко* // Вопросы ихтиологии. – 1993. – Т.33, № 3. – С.382–387.
  3. *Войнова Н.В.* Генетическая паспортизация осетровых: практические и теоретические аспекты / *Н.В. Войнова* – М.: ВНИРО, 2004. – 189 с.
  4. *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.
  5. *Дубін О.В., Шостак Л.В., Димань Т.М.* Генетичний поліморфізм російського осетра за ISSR-маркерами / *О.В. Дубін, Л.В. Шостак, Т.М. Димань* // Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2010. – Вип. 7, № 17. – С.44–47.
  6. *Peakall, R., Smouse, P.E.* 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.
  7. *Nei M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations / *M. Nei* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1973. – Vol. 70. – P.3321–3323.
- 
-