

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ МІКРОСАТЕЛІТНОЇ
ДНК У ГЕНЕТИЧНІЙ СТРУКТУРІ ПОПУЛЯЦІЇ БЕСТЕРА
(*ACIPENSER NIKOLJUKINII*)**

***О. О. Малишева, науковий співробітник
В. Г. Спиридонов, доктор сільськогосподарських наук
С. Д. Мельничук, доктор біологічних наук
Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК
смт. Чабани***

*Досліджено за мікросателітними маркерами ДНК генетичний поліморфізм гібрида білуги зі стерляддю – бестера (*Acipenser Nikoljukinii*). Було ідентифіковано 56 алельних варіантів за такими досліджуваними ДНК-маркерами: LS-19, LS-68, LS-39, Aox-27, LS-54 та Aox-45. Найбільш поліморфним виявився локус LS-68, а найменш поліморфним – локус Aox-27. На основі проведених досліджень та розрахунків виявлено тенденцію переходу алельних варіантів досліджуваної популяції бестера у гомозиготний стан, що свідчить про негативний вплив штучного відтворення на генетичну різноманітність цього міжвидового гібрида осетрових риб.*

Алельні варіанти, мікросателітні маркери ДНК, бестер, локус, поліморфізм.

У зв'язку з підвищенням неконтрольованим виловом, погіршенням екологічного стану місць природного нагулу і нересту, риби родини осетрових (*Acipenseridae*) опинилися на межі майже повного зникнення [2]. Нині єдиною альтернативою збільшення обсягів виробництва осетрової продукції в Україні є розвиток штучного відтворення та вирощування домашикованих стад осетрових видів риб [4].

Згідно з аналізом технологічних параметрів та рибницько-біологічних показників, одним із найбільш зручних та прийнятних об'єктів сучасного товарного осетрівництва є бестер (*Acipenser Nikoljukinii*) – гібрид білуги (*Huso huso*) зі стерляддю (*Acipenser ruthenus*) уперше отриманий в 1952 році Н. І. Ніколюкіним [1, 10]. Бестер є одним із найбільш продуктивних представників родини осетрових, який поєднує в собі цінні господарські властивості обох батьківських форм: швидкий темп росту – від білуги й порівняно раннє досягнення статевої зрілості та властивість мешкати у прісній воді – від стерляді. Цей міжвидовий гібрид виявився здатним до відтворення, достатньо керованим у промисловому відношенні та пластичним до різних умов вирощування. Тому бестер є цінним та бажаним об'єктом товарного осетрівництва, промислове вирощування якого з кожним роком збільшується [11, 13].

Успішність робіт зі штучного відтворення значною мірою залежить від знання та розуміння генетичних процесів, які відбуваються у популяціях. На сучасному етапі визначення генетичної структури та популяційної різноманітності здійснюється із застосуванням молекулярно-генетичних методів досліджень [3, 5]. Поряд із використанням аналізу нуклеотидних послідовностей мітохондріальної ДНК, поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP), аналізу локусів ядерної ДНК з використанням випадкових праймерів (RAPD), дедалі більшого розповсюдження набуває використання мікросателітних маркерів ДНК [12, 14, 17]. Мікросателіти характеризуються високою швидкістю мутацій і кодомінантним типом успадкування, що дає змогу проводити видову та популяційну диференціацію між окремими особинами через високий рівень алельних варіацій. Використання мікросателітів дозволяє проводити моніторинг за генетичними процесами у природних і штучних популяціях та забезпечує дотримання умов збереження генетичного різноманіття цінних і зникаючих видів риб [16, 22].

В умовах Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК протягом останніх років проводяться науково-дослідні роботи з ідентифікації та вивчення генетичної структури осетрових видів риб, серед яких вже досліджено такі види, як російський осетер, стерлядь і севрюга [6, 7, 9]. Наступним для молекулярно-генетичних досліджень було обрано бестера, який серед різних видів і гібридних форм осетрових риб є одним із найбільш оптимальних об'єктів для поєднання товарного вирощування та організації ефективного виробництва харчової чорної ікри [10, 13].

Мета досліджень – ідентифікація алельних варіантів популяції бестера та вивчення його генетичної структури за мікросателітними маркерами ДНК.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом досліджень була вибірка із 34 особин бестера, які утримуються на базі ПП «Біосила» Київської обл. Відбір зразків для досліджень було здійснено прижиттєво методом відтинання фрагмента грудного або хвостового плавця. Відібраний біологічний матеріал фіксували 96% етанолом у спеціально промаркованих стерильних пробірках. Виділення ДНК проводили з використан-

ням набору "ДНК-сорб-В" («Амплі-Сенс», Росія), згідно з інструкцією виробника.

Для молекулярно-генетичних досліджень було використано шість мікросателітних маркерів ДНК: LS-19, LS-68, LS-39, LS-54, Аох-27 і Аох-45, нуклеотидні послідовності яких депоновано в міжнародній генетичній базі даних GenBank [19, 20]

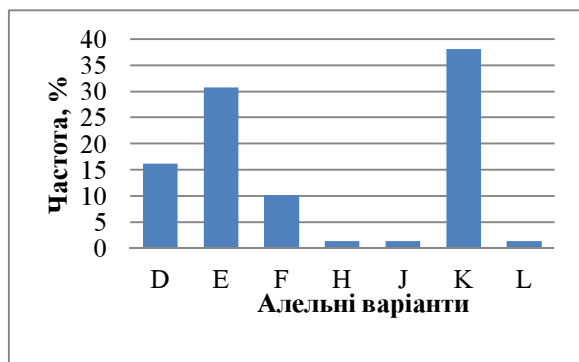
Полімеразну ланцюгову реакцію проводили з умовами, оптимізованими на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК [8]. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли шляхом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі "ABI Prism 3130" Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми "Gene Mapper 3.7" (Applied Biosystems, США) з використанням розмірного стандарту S-450 (Синтол, Росія). Визначення спектра й 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 Power Stats V12 (Promega) [18, 21].

Результати досліджень. У результаті проведеної роботи з вивчення поліморфізму мікросателітних маркерів, у досліджуваній популяції бестера було ідентифіковано 56 алелів (див. рисунок).

У роботі з ідентифікації алелів ми розробили та застосували власну номенклатуру з використанням літер латинського алфавіту. Така номенклатура кодує визначені алелі за кожним з досліджуваних мікросателітних маркерів ДНК і надає зручності у сприйнятті та оперуванні даними [6, 7].

За локусом LS-19 було виявлено 7 алельних варіантів, серед яких найчастіше зустрічали алельний варіант K (38,2%), алельні варіанти H, J та L зустрічалися найменше (1,5%). Локус LS-68 був найбільш поліморфним і містив 19 алельних варіантів. Найчастіше зустрічався алельний варіант P із частотою 19,1%, а найменше – алельні варіанти E, K, O, W, Z3, Z5 та Z6 із однаковою частотою 1,5%. Локус Аох-27 був найменш поліморфним серед досліджуваних маркерів і складався з 5 алельних варіантів. Найчастіше зустрічався алельний варіант I (58,8%), а найменше – алельний варіант K (1,5%). За локусом LS-54 було виявлено 10 алельних варіантів, серед яких варіант G зустрічався найчастіше (33,7%), тоді як алельні варіанти J, K, M, V, W зустрічалися найменше з однаковою частотою (2,9%). За локусом LS-39 було виявлено 6 алельних варіантів, серед яких варіант O зустрічався з найбільшою частотою 36,8%, тоді як варіанти L, M та P зустрічалися з однаковою найменшою частотою 4,4%. За локусом Аох-45 було виявлено 9 алельних варіантів, серед яких найчастіше зустрічався варіант H (32,4%), а найменше – варіант N (1,5%).

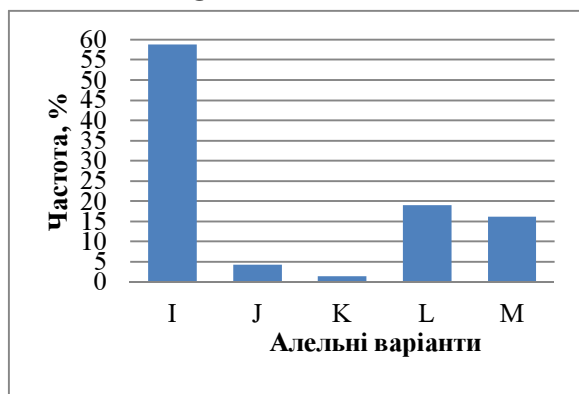
За розрахунками параметрів гетерозиготності було виявлено, що рівень фактичної гетерозиготності (H_o) коливався від 0,235 для локусу LS-54 до 0,912 для локусу Аох-45 (див. таблицю).



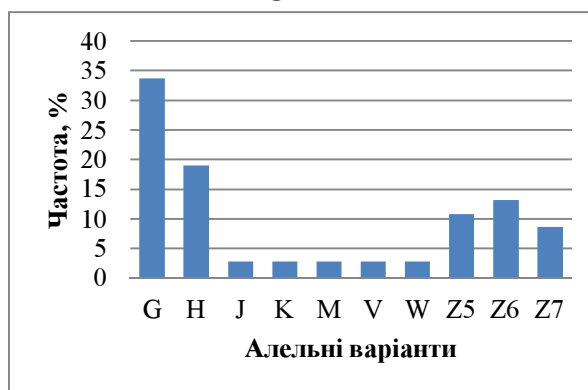
LS-19



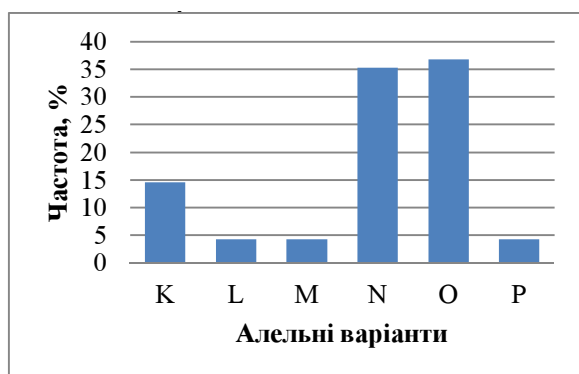
LS-68



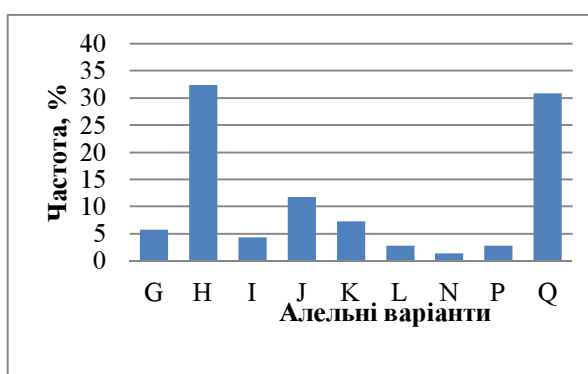
Aox27



LS-54



LS-39



Aox45

Як показано у нижченаведеній таблиці, рівень теоретично очікуваної гетерозиготності (H_e) коливався в межах від 0,598 до 0,918 для локусів Aox-27 та LS-68, відповідно. У середньому фактична гетерозиготність була на рівні 0,564, тоді як середнє значення теоретично очікуваної гетерозиготності було вищим і становило 0,775 ($H_e > H_o$), що свідчить про нестачу гетерозиготних генотипів у досліджуваній популяції бестера.

Індекс поліморфізму (PIC) для бестера коливався від 0,542 для локусу Aox-27 до 0,898 для локусу LS-68, що свідчить про те, що локус Aox-27 є найменш поліморфним, а локус LS-68 – найбільш поліморфним. Середнє значення індексу поліморфізму для досліджуваних локусів ДНК

дорівнювало 0,732, що свідчить про достатньо високий рівень поліморфізму за обраними маркерами для даного виду риб ($PIC > 0,500$).

Показники генетичного поліморфізму бестера за мікросателітними локусами

Назва локусу	Кількість алелів	Ho	He	PIC	PE
LS-19	7	0,794	0,732	0,674	0,588
LS-68	19	0,412	0,918	0,898	0,121
LS-39	6	0,294	0,723	0,665	0,061
Аох-27	5	0,735	0,598	0,542	0,485
LS-54	10	0,235	0,821	0,787	0,040
Аох-45	10	0,912	0,859	0,827	0,820
Середнє	9,5	0,564	0,775	0,732	0,353
				CPE	0,970

Показник вірогідності виключення випадкового збігу алелів (PE) становив у середньому 0,353, і коливався від 0,040 до 0,820 для локусів LS-54 та Аох-45, відповідно. Значення комбінованої вірогідності виключення випадкового збігу алелів (CPE) дорівнювало 0,970, що свідчить про достатньо високий рівень інформативності обраної панелі мікросателітних маркерів ДНК. Використання досліджуваної панелі маркерів дає змогу проводити генотипування бестера з вірогідністю не менш ніж 97%.

Висновки

Проведені нами дослідження за мікросателітними маркерами ДНК свідчать про ефективність використання мікросателітних локусів для ідентифікації алельних варіантів та популяційно-генетичного аналізу бестера. За обраною панеллю із шести мікросателітних маркерів було ідентифіковано 57 алелів. Найбільш поліморфним виявився локус LS-68 (19 алельних варіантів), локус Аох-27 був найменш поліморфним (5 алельних варіантів).

На основі проведених популяційно-генетичних розрахунків було встановлено, що в генетичній структурі бестера спостерігається тенденція до переходу алелів у гомозиготний стан, що, у свою чергу, є результатом негативного впливу на алелофонд цих риб умов штучного вирощування та відтворення.

Список літератури

1. Арефьев В. А. О видовом статусе бестера *Acipenser nkoljukini* / В. А. Арефьев, И. А. Бурцев // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб : тезисы докладов междунар. конф. к 100-летию В. С. Кирпичникова 10–12 сент. 2008 г. / ГосНИОРХ. – Санкт-Петербург, 2008. – С. 87–88.
2. Баранникова И. А. Проблема сохранения осетровых в современный период / И. А. Баранникова, С. И. Никоноров, А. Н. Белоусов // Осетровые на рубеже XXI века : тезисы докладов междунар. конф. – Астрахань, 2000. – С. 7–9.
3. 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. – М., 2013. – Т. 49. – № 9. – С. 1093–1105.

4. Грициняк І. І. Історичні аспекти, стан та перспективи розвитку рибогосподарської діяльності на внутрішніх водоймах України / І. І. Грициняк, О. М. Третяк, О. М. Колос // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». – Суми, 2014. – Вип. 2/1 (24). – С. 22–29.

5. Козлова Н. В. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб / Н. В. Козлова, Н. Н. Базелюк, Д. Р. Файзулина, Е. В. Стоногина // Вестник АГТУ. Серия «Рыбное хозяйство». – Астрахань, 2013. – № 3. – С.113–117.

6. Малишева О. О. Генетична структура популяції стерляді (*Acipenser ruthenus*) за мікросателітними маркерами ДНК / О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». – Суми, 2014. – Вип. 2/1 (24). – С. 212–215.

7. Малишева О. О. Поліморфізм мікросателітних маркерів ДНК севрюги (*Acipenser stellatus, Pallas*) / О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук // Біоресурси і природокористування. – К., 2014. – № 7. – С. 11–15.

8. Резнікова-Галашевич І. С. Генетична ідентифікація промислових видів риб : метод. рекомендації / [І. С. Резнікова-Галашевич, В. В. Степура, А. В. Шельов та ін.]. – К. : НУБіП України, 2011. – 35 с.

9. Резнікова-Галашевич І. С. Дослідження мтДНК російського осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) / І. С. Резнікова-Галашевич, А. В. Шельов, В. Г. Спиридонов [та ін.] // Рибогосподарська наука України. – К., 2012. – № 1. – С.15–21.

10. Третяк О. М. Стан запасів осетрових риб та розвиток осетрової аквакультури в Україні / О. М. Третяк, Б. О. Ганкевич, О. М. Колос [та ін.] // Рибогосподарська наука України. – К., 2010. – № 4. – С. 4–22.

11. Филиппова О. П. Влияние температурных условий выращивания бестера (*Acipenser nikoljukini*) на длительность гаметогенеза и возраст достижения половой зрелости в установках замкнутого водообеспечения и в прудах / [О. П. Филиппова, И. А. Бурцев, А. С. Сафронов [и др.] // Труды ВНИРО. – М., 2009. – Т.148. – С. 170–179.

12. Barmintsev V. Molecular genetic identification of bester strains (*H.huso* x *A.ruthenus*, sin. *A. Nikoljukinii*) / Barmintsev V., Barmintseva A., Muge N. // Twenty-third meeting of the Animals Committee, 19–24 april, 2008 // Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. – Geneva, 2008. – AC23 Doc. Inf.1. – P.1.

13. Burtsev I. A. Bester in aquaculture / I. A. Burtsev // The CITES Sci. Authority on Sturgeon Species in the Rus. Federation. – М. : VNIRO, 2007. – P. 8.

14. Chistiakov D. A. Microsatellites and their genomic distribution evolution function and applications: A review with special reference to fish genetics / D. A. Chistiakov, B. Hellemans // Review. Aquacul, 2005. – P. 29.

15. Dudu A. Nuklear Markers of Danube Sturgeons Hybridization / A. Dudu, R. Suci, M. Parashiv [et al.] // Molecular Sciences. – 2011. – Vol. 12. – P. 6796–6809.

16. Fopp-Bayat D. Microsatellite DNA polymorphism in sturgeon species and their hybrids reared in Polish aquaculture farms / D. Fopp-Bayat, M. Luczynski // Environmental biotechnology. – 2006. – Vol. 2 (1). – P. 11–19.

17. Henderson A. A. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management / A. A. Henderson, T. L. King // *Mol. Ecology Notes*. – 2002. – Vol. 2. – P. 437–439.

18. Kalinowski S. T. 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. – Vol. 16, N. 5. – P. 1099–1106.

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

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

21. Marshall T. C. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations / T. C. Marshall, J. Slate, L. Kruuk [et al.] // *Mol. ecol.* – 1998. – P. 639–655.

22. McQuown E. C. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: New primer sequences for *Scaphyrinchus* and *Acipenser* / E. C. McQuown, B. L. Sloor, R. J. Sheehen [et al.] // *Am. Fish. Soc.* – 2000. – Vol. 129. – P. 1380–1388.

Исследован по микросателлитным маркерам ДНК генетический полиморфизм гибрида белуги со стерлядью – бестера (Acipenser Nikoljukini). Было идентифицировано 56 аллельных вариантов по исследуемым ДНК-маркерам LS-19, LS-68, LS-39, Aox-27, LS-54 и Aox-45. Наиболее полиморфным оказался локус LS-68, а наименее полиморфным – локус Aox-27. На основании проведенных исследований и расчетов выявлена тенденция перехода аллельных вариантов исследуемой популяции бестера в гомозиготное состояние, что указывает на негативное влияние искусственного воспроизводства на генетическое разнообразие этого межвидового гибрида осетровых рыб.

Аллельные варианты, микросателлитные маркеры ДНК, бестер, локус, полиморфизм.

It was investigated genetic polymorphism of microsatellite DNA markers of hybrid beluga and sterlet – bester (Acipenser Nikoljukini). From DNA markers studied LS-19, LS-68, LS-39, Aox-27, LS-54 and Aox-45 it was identified 56 allelic variants. It was found that the LS-68 locus was the most polymorphic, and the least polymorphic - Aox-27. Based on this data and calculations we have shown a trend of substitutions of allelic variants of observed population in the homozygous state of bester, indicating the negative impact of its artificial reproduction.

Allele variations, microsatellite DNA markers, bester, locus, polymorphism.