

ВНУТРІШНЬОВИДОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНОЇ ДНК РОСІЙСЬКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII* BRANDT)

О. О. Малишева, malisheva.sirota@gmail.com, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

К. І. Мошнягул, Moshnjagul@mail.ru, Дніпровський осетровий рибовідтворювальний з-д ім. академіка С. Т. Артющика, с. Дніпровське, Білозерський р-н, Херсонська обл.

Л. М. Шинкаренко, IBK_line@mail.ru, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

І. В. Андреев, ymdd1@ukr.net, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

В. Г. Спиридонов, spyrydonov@ukr.net, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Мета. *Визначення особливостей внутрішньовидового генетичного поліморфізму російського осетра за мікросателітними ДНК-маркерами.*

Методика. *Для визначення внутрішньовидового поліморфізму мікросателітної ДНК російського осетра використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією результатів за методом капілярного електрофорезу.*

Результати. *За мікросателітними маркерами ДНК проведено дослідження генетичного поліморфізму диких особин російського осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) чорноморсько-дніпровської популяції. Було ідентифіковано 56 алельних варіантів за такими ДНК-маркерами, як LS-19, LS-68, LS-39, LS-54, Aox-27 та Aox-45. Найбільш поліморфним виявився локус LS-68, а найменш поліморфним — локус Aox-27. За досліджуваними ДНК-маркерами було встановлено тетраплоїдність генетичної структури цього виду осетрових риб.*

Наукова новизна. *Вперше отримано нові дані щодо особливостей внутрішньовидового генетичного поліморфізму російського осетра з використанням видоспецифічних мікросателітних ДНК-маркерів.*

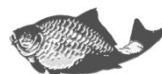
Практична значимість. *Отримані дані можуть бути застосовані для контролю генетичних процесів у популяціях російського осетра, а також для розроблення комплексу заходів щодо підвищення ефективності розведення та збереження структури і видового різноманіття цього виду осетрових риб.*

Ключові слова: *російський осетер, мікросателітні ДНК-маркери, полімеразна ланцюгова реакція, локус, алельний варіант, поліморфізм.*

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Осетрові риби є не лише цінними об'єктами вітчизняної і світової аквакультури, але й являють собою важливу складову біосфери. У зв'язку з погіршенням екологічних умов існування та неконтрольованим виловом, за

© О. О. Малишева, К. І. Мошнягул, Л. М. Шинкаренко, І. В. Андреев,
В. Г. Спиридонов, 2016



останні півстоліття осетрові види риб опинилися на межі майже повного зникнення. Тому виникає особливий інтерес щодо їх відтворення та збереження як у природі, так і в штучних умовах [1, 2].

Одним із цінних представників осетрових риб є російський осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) — важливий об'єкт промислу та один з основних об'єктів сучасного товарного осетрівництва. Збереження цього виду та підтримання його нормальної чисельності передбачають відтворення генетичного різноманіття з урахуванням його популяційної структури [3, 4].

Сучасні розробки в галузі молекулярної генетики дозволяють використовувати ефективні маркери в генетичних дослідженнях осетрових, а саме — мікросателітні локуси ДНК, які дозволяють оцінити внутрішньовидовий генетичний поліморфізм та надають можливість відмічати різницю між популяціями через високий рівень алейних варіацій [5, 6]. Встановлення генетичної різноманітності російського осетра дасть змогу розроблення планів відновлення його запасів та управління структурою популяцій в природних та штучних умовах існування.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

У вирішенні питань забезпечення ефективності відтворення та збереження осетрових риб, все більшого розповсюдження набуває використання сучасних методів молекулярно-генетичних досліджень із застосуванням мікросателітних ДНК-маркерів. Використання цих маркерів дозволяє оцінити генетичний поліморфізм популяцій, здійснити видову або ж індивідуальну ідентифікацію та генетичну паспортизацію, підтвердити достовірність походження отриманих нащадків [7, 8].

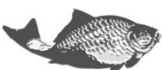
Метою роботи було визначення внутрішньовидового генетичного поліморфізму російського осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) за мікросателітними ДНК-маркерами.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень була ДНК, виділена з фрагментів грудних плавців від диких плідників російського осетра, які були виловлені у пониззях Дніпра у період нерестового ходу для робіт зі штучного відтворення на базі виробничо-експериментального Дніпровського осетрового рибовідтворювального заводу ім. академіка С.Т. Артющика.

Біологічний матеріал для ДНК-досліджень відбирали зажиттєво шляхом акуратного відтинання фрагменту грудного чи хвостового плавця за допомогою стерильних інструментів. Відібраний біологічний матеріал фіксували 96%-им етанолом у спеціально промаркованих стерильних пробірках індивідуально для кожної особини. Виділення геномної ДНК проводили згідно з інструкцією виробника, використовуючи набір «ДНК-сорб-В» («Амплі-Сенс», Росія) [9].

Для визначення внутрішньовидового генетичного поліморфізму було використано шість мікросателітних ДНК-маркерів — LS-19, LS-68, LS-39, LS-54, Aox-27 та Aox-45, нуклеотидні послідовності яких знаходяться в міжнародній генетичній базі даних Gen Bank [10, 11].



Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали на ампліфікаторі Veriti 96 Well (Applied Biosystems, США). Фрагментний аналіз проводили на генетичному аналізаторі ABI Prism «3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystems, США) з використанням розмірного стандарту S-450 (Синтол, Росія).

Ідентифіковані алелі позначалися буквами латинської абетки згідно з попередньо розробленою номенклатурою для даних мікросателітних ДНК-маркерів [12].

Визначення спектру частот ідентифікованих алелів проводили за методом підрахунку та аналізу отриманих генотипів досліджуваних особин із застосуванням програми Power Stats V12 (Promega) [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті мікросателітного аналізу внутрішньовидового поліморфізму російського осетра були отримані дані щодо особливостей генетичної структури цього виду та ідентифіковано від 7 алелів для локусу Aox-27 до 21 алеля для локусу LS-68 (рис. 1).

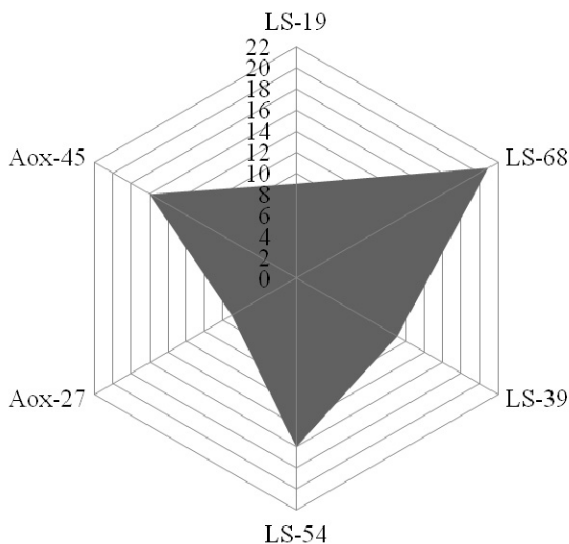
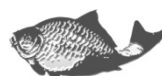


Рис. 1. Генетичний профіль російського осетра (*Acipenser gueldenstadtii Brandt*) за мікросателітними ДНК-маркерами, n=22

За локусом LS-19 було ідентифіковано 9 алельних варіантів, серед яких найчастіше (31,7%) траплявся алельний варіант E, тоді як алельні варіанти A1 та G виявлялися найрідше (1,6%).

Локус LS-68 був найбільш поліморфним і містив 21 алель. Найчастіше траплявся алельний варіант D з частотою 13,2%, а найменше — алельні варіанти A1, I, J, V, Y та Z6 з однаковою частотою — 1,6% (рис. 2).

Для локуса LS-39 було ідентифіковано 11 алельних варіантів, серед яких варіант T траплявся з найбільшою частотою — 27,8%, тоді як варіанти L, M та Z виявлялися з однаковою найменшою частотою — 1,9%.



**ВНУТРІШНЬОВИДОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНОЇ
ДНК РОСІЙСЬКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII* BRANDT)**

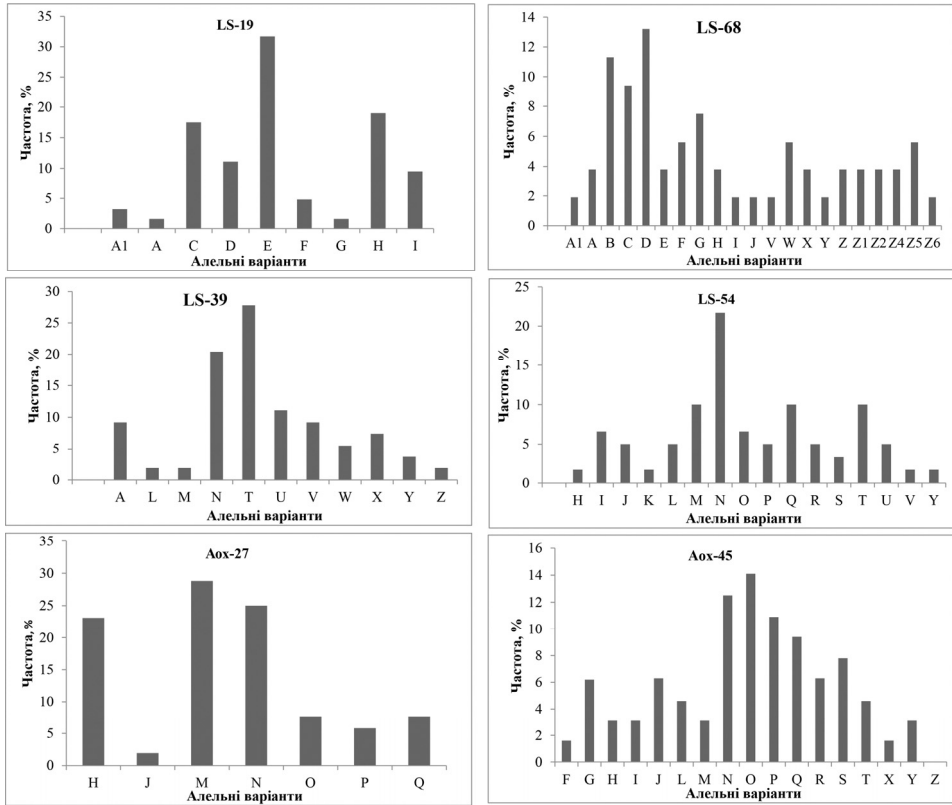


Рис. 2. Генетична структура російського осетра (*Acipenser giueldenstadtii* Brandt), n=22

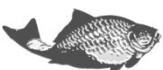
За локусом LS-54 було ідентифіковано 16 алеельних варіантів, серед яких найчастіше виявлявся алеельний варіант N з частотою 21,7%, тоді як алеельні варіанти H, K, V, Y траплялися найрідше, з однаковою частотою — 1,7%.

Локус Aox-27 був найменш поліморфним серед досліджуваних маркерів і становив 7 алеельних варіантів, серед яких алеель M виявлявся найчастіше (28,85%), а алеель J, навпаки, траплявся найрідше (1,9%).

За локусом Aox-45 було ідентифіковано 16 алеельних варіантів, серед яких найчастіше виявлявся варіант O (14,1%), а найменше — варіанти F та X (1,6%).

Вивчення генетичної структури російського осетра не було проведено в повному обсязі і зводилося лише до оцінювання за кількістю визначених алеельних варіантів та відносною частотою алелів. Розрахунки параметрів гетерозиготності для російського осетра ускладнювалися встановленням тетраплоїдної генетичної структури цього виду риб за досліджуваними ДНК-маркерами, що узгоджується з літературними даними інших закордонних і вітчизняних науковців [7, 14].

Таким чином, мікросателітний аналіз ДНК дозволив визначити особливості генетичної структури та виявити різницю між алеельними варіантами за кожним з досліджуваних мікросателітних ДНК-маркерів для російського осетра чорноморсько-дніпровської популяції.



ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Проведені дослідження свідчать про ефективність використання мікросателітних локусів ДНК для ідентифікації алельних варіантів та популяційно-генетичного аналізу російського осетра. За обраною панеллю з 6 мікросателітних маркерів було ідентифіковано 56 алельних варіантів. Найбільш поліморфним виявився локус LS-68 (21 алельний варіант), локус Aox-27 був найменш поліморфними (7 алельних варіантів). За досліджуваними ДНК-маркерами було встановлено тетраплоїдність генетичної структури російського осетра.

Дослідження подібного плану є важливою складовою ланкою в подальших роботах щодо збереження генетичного різноманіття осетрових риб, що дасть можливість здійснення державою контролю відтворення і збереження запасів цінних та зникаючих видів риб в умовах посиленого антропогенного тиску на природні водойми.

ЛІТЕРАТУРА

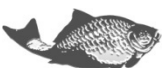
1. Birstein V. J. The threatened status of acipenseriform species: a summary / V. J. Birstein, W. E. Bemis, J. Waldman // *Developments in Environmental Biology of Fishes*. — 2002. — P. 427—435. doi: 10.1007/0-306-46854-9_33.
2. Стан запасів осетрових риб та розвиток осетрової аквакультури в Україні / О. М. Третяк, Б. О. Ганкевич, О. М. Колос [та ін.] // *Рибогосподарська наука України*. — 2010. — № 4. — С. 4—22.
3. Birstein V. J. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches / V. J. Birstein, R. Hanne, R. DeSalle // *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. — Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 1997. — P. 127—155.
4. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб / Н. В. Козлова, Н. Н. Базелюк, Д. Р. Файзулина [и др.] // *Вестник АГТУ*. — 2013. — № 3. — С. 113—117. — (Серия : Рыбное хозяйство).
5. Тимошкина Н. Н. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) / Н. Н. Тимошкина // *Генетика популяций и эволюция*. — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 12—25.
6. Барминцева А. Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявление особей гибридного происхождения / А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге // *Генетика животных*. — 2013. — Т. 49, № 9. — С. 1093—1105.
7. Nuclear Markers of Danube Sturgeons Hybridization / A. Dudu, R. Suci, M. Parashiv [at al.] // *Molecular Sciences*. — 2011. — Vol. 12. — P. 6796—6809.
8. Войнова Н. В. Генетическая паспортизация осетровых: практические и теоретические аспекты / Войнова Н. В. — М. : ВНИРО, 2004. — 189 с.
9. Carter M. J. 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.



10. 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. AquatSci.* — 1997. — Vol. 54. — P. 1542—1547.
11. 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.
12. 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.* — 2014. — Вип. 2/1 (24). — С. 212—215. — (Серія : Тваринництво).
13. Marshall T. C. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations / T. C. Marshall [et al.] // *Mol. ecol.* — 1998. — P. 639—655.
14. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species / M. Lanfredi, L. Congiu, M. Garrido-Ramos [et al.] // *Chromosome Research.* — 2001. — № 9. — P. 47—52.

REFERENCES

1. Birstein, V. J., Bemis, W. E., & Waldman, J. (2002). The threatened status of acipenseriform species: a summary. *Developments in Environmental Biology of Fishes*, 427-435. doi: 10.1007/0-306-46854-9_33.
2. Tretiak, O. M., Hankevych B. O., Kolos O. M., & Yakovlieva, T. V. (2010). Stan zapasiv osetrovkyh ryb ta rozvytok osetrovoi akvakultury v Ukraini. *Rybohospodarska nauka Ukrainy*, 4, 4-22.
3. Birstein, V. J., Hanne, R., & DeSalle, R. (1997). Phylogeny of the *Acipenseriformes*: Cytogenetic and molecular approaches. *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 127-155.
4. Kozlova, N. V., Bazelyuk, N. N., Fayzulina, D. R., & Stonogina, E. V. (2013). Primenenie molekulyarno-geneticheskikh issledovaniy v akvakul'ture osetrovkyh ryb. *Vestnik AGTU*, 3, *Seriya: Rybnoe khozyaystvo*, 113-117.
5. Timoshkina, N. N. (2010). Molekulyarno-geneticheskie markery v issledovanii vnutri- i mezhvidovogo polimorfizma osetrovkyh ryb (*Acipenseriformes*). *Genetika populyatsiy i evolyutsiya*, 8, 1, 12-25.
6. Barmintseva, A. E., & Myuge, N. S. (2013). Ispol'zovanie mikrosatelitnykh lokusov dlya ustanovleniya vidovoy prinaldzhnosti osetrovkyh (*Acipenseridae*) i vyyavlenie osobey gibridnogo proiskhozhdeniya. *Genetika zhivotnykh*, 49, 9, 1093-1105.
7. Dudu, A., Suci, R., & Parashiv, M., et al. (2011). Nuklear Markers of Danube Sturgeons Hybridization. *Molecular Sciences*, 12, 6796-6809.
8. Voynova, N.V. (2004). *Geneticheskaya pasportizatsiya osetrovkyh: prakticheskie i teoreticheskie aspekty*. Moskva : VNIRO.
9. Carter, M. J., & Milton, I. D. (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1044-1046.
10. May, B., Krueger, C. C., & Kincaid, H. L. (1997). Genetic variability at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirinchus*. *Can. J. Fish. AquatSci*, 54, 1542-1547.



11. King, T. L., Lubinski, B. A., & Spidle, A. P. (2001). Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and crossamplification in the *Acipenseridae*. *Conservation Genetics*, 2, 103-119.
12. Malysheva, O. O., Spyrydonov V. H., & Melnychuk, S. D. (2014). Hnetychna struktura populiatsii sterliadi (*Acipenser ruthenus*) za mikrosatelitnymi markerami DNK. *Visnyk sumskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu: Seriya Tvarynyystvo*, 2/1 (24), 212-215.
13. Marshall, T. C. et al. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. ecol.*, 639-655.
14. Lanfredi, M., Congiu, L., Garrido-Ramos, M. et al. (2001). Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research*, 9, 47-52.

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК РУССКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII* BRANDT)

О. А. Малышева, malisheva.sirota@gmail.com, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

К. И. Мошнягул, Moshnjagul@mail.ru, Днепропетровский осетровый рыбо-производительный завод им. академика С. Т. Артющика, с. Днепропетровское, Белозерский р-н, Херсонская обл.

Л. Н. Шинкаренко, IBK_line@mail.ru, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

И. В. Андреев, ymdd1@ukr.net, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

В. Г. Спиридонов, spyrydonov@ukr.net, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

Цель. Определение особенностей внутривидового генетического полиморфизма русского осетра по микросателлитным ДНК-маркерам.

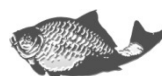
Методика. Для определения внутривидового полиморфизма микросателлитной ДНК русского осетра использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов по методу капиллярного электрофореза.

Результаты. По микросателлитным маркерам ДНК проведены исследования генетического полиморфизма русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) черноморско-днепровской популяции. Было идентифицировано 56 аллельных вариантов по таким исследуемым ДНК-маркерам, как 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. По всем исследуемым ДНК-маркерам была установлена тетраплоидность генетической структуры данного вида осетровых рыб.

Научная новизна. Впервые получены новые данные относительно особенностей внутривидового генетического полиморфизма русского осетра с использованием видоспецифических микросателлитных ДНК-маркеров.

Практическая значимость. Полученные данные могут быть использованы для контроля генетических процессов в популяциях русского осетра, а также для разработки комплекса мер по повышению эффективности разведения и сохранения структуры и видового разнообразия этого вида осетровых рыб.

Ключевые слова: русский осетр, микросателлитные ДНК-маркеры, полимеразная цепная реакция, локус, аллельный вариант, полиморфизм.



**INTRASPECIFIC POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE DNA
OF RUSSIAN STURGEON (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII* BRANDT)**

O. Malysheva, malysheva.sirota@gmail.com, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

K. Moshnjagul, Moshnjagul@mail.ru, Dnieper sturgeon fish-reproductive plant named after academician S. T. Artyuschika, vill. Dneprovskoe, Belozersky district, Kherson region

L. Shynkarenko, IBK_line@mail.ru, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

I. Andrieiev, vmdd1@ukr.net, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

V. Spyrudonov, spyrudonov@ukr.net, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

Purpose. Determination of the peculiarities of intraspecific genetic polymorphism of Russian sturgeon based on microsatellite DNA markers.

Methodology. The polymerase chain reaction (PCR) with the detection of results based on capillary electrophoresis was used for the determination of intraspecific polymorphism of microsatellite DNA Russian sturgeon.

Findings. On microsatellite DNA markers was investigated genetic polymorphism of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) Black Sea and Dnieper population. It was identified of 56 allelic variants of such DNA-markers investigated as LS-19, LS-68, LS-39, Aox-27, LS-54 and Aox-45. On locus LS-19 allelic variants have been identified, the locus LS-68 was the most polymorphic and consisted of 21 alleles, 11 allelic variants have been identified by the LS-39 locus, and 16 allelic variants have been identified for the LS-54 locus. Aox-27 locus was the least polymorphic microsatellite markers among the study and consisted of 7 allelic variants. For Aox-45 locus 16 allelic variants have been identified. A study of the genetic structure of the Russian Black Sea-Dnieper sturgeon population is not currently been carried out in full and reduced only to the evaluation of the number of identified allelic variants and relative frequency of alleles. Calculations of heterozygosity parameters for Russian sturgeon became complicated definition tetraploid genetic structure of this species on the studied DNA markers. Such studies are an important component in the further work on the conservation of genetic diversity of sturgeon, which will provide an opportunity to carry out the state control over reproduction and preservation of valuable and endangered species under increased anthropogenic impact on natural populations.

Originality. For the first time, new data of the peculiarities of the intraspecific genetic polymorphism of Russian sturgeon was obtained using species-specific microsatellite DNA markers.

Practical value. The data obtained can be used to control the genetic processes in the populations of Russian sturgeon, as well as to develop a complex of measures to improve the efficiency of breeding and conservation of the structure and species diversity of this sturgeon species.

Keywords: Russian sturgeon, microsatellite DNA markers, polymerase chain reaction, locus, allelic variant, polymorphism.

