

МІЩУК Я.М.^{1✉}, СЕРГА С.В.¹, РАДІОНОВ Д.Б.², ЗАМОРОВ В.В.², ЧУЙКО В.Ю.²,
ЧЕБОТАР С.В.², КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

² Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: bio@onu.edu.ua

✉slavamishchuk@gmail.com, (044) 522-39-95

ПОЛІМОРФІЗМ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМ ЛОКУСОМ *Ame17* У БИЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОГО ПРИЧОРНОМОР'Я

Серед бичкових риб роду *Neogobius* найбільш чисельним та широко розповсюдженим в Україні є бичок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814), що зумовлено його евригалінністю, еврифагією та здатністю вживати молюски, які не придатні до споживання іншим видам [1]. Бичок-кругляк належить до ендемічної монофілетичної групи близьких видів риб Понто-Каспійського басейну, природним ареалом якого є Чорне, Азовське, Мармурове та Каспійське моря, а також водойми річкових систем, що в них впадають [2–4].

Не так давно ареал існування бичка-кругляка поширився на великі річки Понто-Каспійського регіону та Східної Європи, а також Балтійське море та Великі Озера Північної Америки [5, 6]. Вважається, що основним антропогенним засобом, що сприяв інтродукції виду, є баластні води суден, в які потрапляла молодь риб. Саме цей механізм призвів до колонізації Балтійського моря, водойм Північної Америки та верхів'я річки Волга. Інтродуковані популяції, ймовірно, мігрували, щоправда з меншою швидкістю, уздовж каналів [7, 8].

Згідно з екологічною теорією, інтродуковані популяції можуть мати лімітований адаптивний потенціал, що зумовлено невеликим генетичним різноманіттям, оскільки нова територія заселялася невеликою кількістю представників цього виду, таке явище відоме як «ефект засновника» [9, 10]. Проте було показано, що часто нові популяції характеризуються не меншим, а інколи навіть більшим генетичним різноманіттям, що є результатом адаптації до нових умов [8, 11].

Поліморфні, кодомінантні ядерні маркери,

зокрема такі, як мікросателітні локуси, є зручним інструментом для оцінки генетичного різноманіття «донор-реципієнт» популяцій та філогеографічної історії їх походження [8, 12]. Аналіз генетичних особливостей популяцій бичка-кругляка може дати уявлення про шляхи та ймовірність успішності інтродукції цього виду [4].

Матеріали і методи

Для дослідження використовували 6 вибірок (чисельністю від 7 до 42 екземплярів) із різних частин природного ареалу бичка-кругляка у Північно-Західному Причорномор'ї (рис.).

Геномну ДНК виділяли з м'язової тканини за допомогою набору Diatom™DNA Prep 200 (Росія) за протоколом фірми-виробника.

Поліморфізм мікросателітного локусу *Ame17* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Були використані праймери: 5'-GGC GCA ACC TCA TTT TAA TC-3' (прямий) та 5'-GTT TAG GCG GGG GTT AAG AG -3' (зворотний) [8]. Величина продуктів ПЛР варіювала в діапазоні 140–300 п. о.

ПЛР проводили за схемою, описаною в літературі [8]: денатурація 3 хв при 94°C, 40 циклів (денатурація 40 с / 94°C, гібридизація праймерів 30 с / 58°C, елонгація 40 с / 72°C), заключний синтез 5 хв при 72°C.

Реакція проводилася в суміші об'ємом 20 мкл (3 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10xПЛР-буферу (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific», USA), 2 мкл 2 мМ дНТФ («Thermo Scientific», USA), по 1 мкл 20 мМ кожного праймера, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од. акт./мкл «Thermo Scientific», USA), 11 мкл дисти-

льованої води).

Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 8 % поліакриламідному гелі.

Відмінності між гетерозиготністю в різних групах розраховували з використанням критерію Фішера для якісних ознак [13].

Результати та обговорення

У результаті аналізу мікросателітного ло-

кусу *Ame17* у бичка-кругляка ідентифіковано 23 алелі, діапазон розміру яких склав від 140 до 300 п. о. Кількість виявлених алелів варіює від 2 у риб у Тилігульському лимані до 20 в локалітеті із Одеської затоки. Мінімальне значення гетерозиготності становить 0,14 для вибірки з Джарилгацької затоки, тоді як вибірка з водосховища Сасик на 100 % була гетерозиготною за цим локусом (табл.).

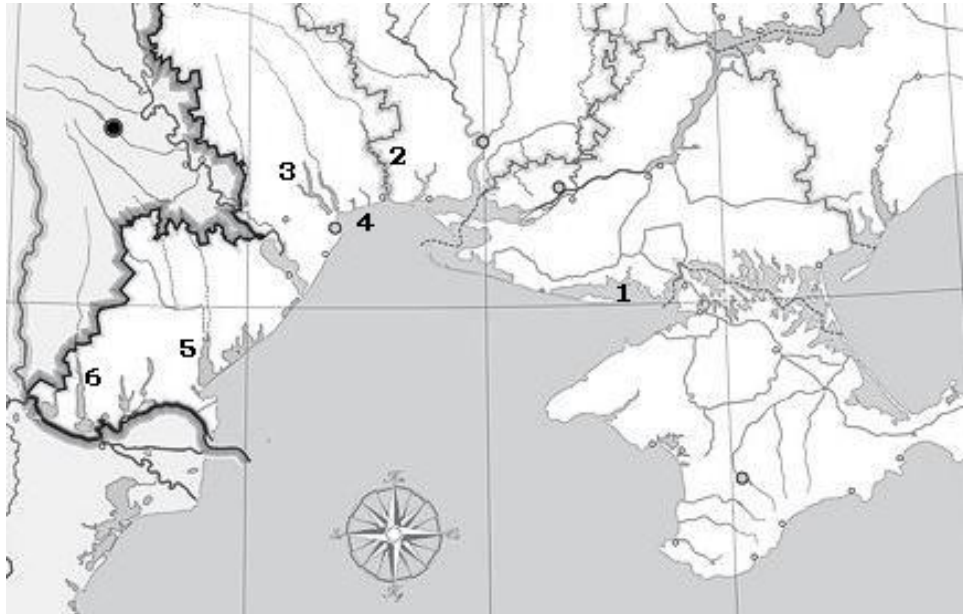


Рис. Карта-схема збору матеріалу: 1 – Джарилгацька затока; 2 – Тилігульський лиман; 3 – Хаджибейський лиман; 4 – Одеська затока; 5 – водосховище Сасик; 6 – озеро Ялпуг.

Таблиця. Характеристика локусу *Ame17* для різних вибірок бичка-кругляка з Північно-Західного Причорномор'я

Акваторії проведення досліджень	Мотив повтору	R_S (п.о.)	N_A	H_O	Кількість екземплярів у вибірці
Джарилгацька затока	(TAG) ₂₉	170-220	4	0,14	7
Тилігульський лиман		175-210	2	0,79	14
Хаджибейський лиман		175-250	4	0,85	13
Одеська затока		150-300	20	0,71	42
Водосховище Сасик		150-220	6	1	12
Озеро Ялпуг		140-210	5	0,93	14
Усього екземплярів					102
Середня гетерозиготність за локусом <i>Ame17</i>					0,76

Примітки: R_S (п.о.) – діапазон розміру повторів; N_A – кількість алелів; H_O – гетерозиготність.

При порівнянні значення H_O для вибірок із різних локацій встановлено, що значуща різниця спостерігається між гетерозиготністю вибірки з Джарилгацької затоки та рештою вибірок ($p < 0,05$). Окрім цього, гетерозиготність вибірки з водосховища Сасик відрізнялась від інших вибірок, окрім озера Ялпуг та Хаджибейського

лиману ($p < 0,05$). Середня гетерозиготність за локусом *Ame17* для досліджуваних груп склала 0,76. Аналогічна гетерозиготність, описана в літературі [4], встановлена для вибірки з Дніпра (м. Херсон), однак тоді було ідентифіковано лише 11 алелів розміром 165–231 п. о. Досить високий рівень генетичного різноманіття дослі-

джуваних угруповань бичка-кругляка також підтверджується виявленням раніше значним поліморфізмом мітохондріального гена *сyt b* серед риб цього виду в Північно-Західному Причорномор'ї [14]. Наші результати не відрізняються від даних, які отримані для популяцій бичка-кругляка з новоосвоєних акваторій Північної Америки, де гетерозиготність становила 0,79, а кількість виявлених алелів – 13 (розміром 165–225 п. о.) [4].

Література

1. Ткаченко М.Ю. Морфологічна мінливість бичка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) морських та прісноводних водойм // Біологічні системи. – 2012. – Т. 4, вип. 4. – С. 525–529.
2. Brown J.E., Stepien C.A. Invasion genetics of the Eurasian round goby in North America: tracing sources and spread patterns // Mol. Ecol. – 2009. – V. 18. – P. 64–79.
3. Kovacic M., Engin S. Two new species of *Neogobius* (Gobiidae) from northeastern Turkey // Cybium. – 2008. – V. 32. – P. 73–80.
4. Feldheim K.A., Willink P., Brown J.E., Murphy D.J., Neilson M.E., Stepien C.A. Microsatellite loci for Ponto-Caspian gobies: markers for assessing exotic invasions // Mol. Ecol. Res. – 2009. – V. 9. – P. 639–644.
5. Skora K.E., Stolarski J. New fish species in the Gulf of Gdansk, *Neogobius* sp. [cf. *Neogobius melanostomus* (Pallas 1811)] // Bulletin of the Sea Fisheries Institute. – 1993. – V. 1. – P. 83–84.
6. Jude D.J., Reider R.H., Smith G.R. Establishment of Gobiidae in the Great Lakes basin // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 1992. – V. 49. – P. 416–421.
7. Hensler S.R., Jude D.J. Diel vertical migration of round goby larvae in the Great Lakes // Journal of Great Lakes Research. – 2007. – V. 33. – P. 295–302.
8. Brown J.E., Stepien C.A. Ancient divisions, recent expansions: phylogeography and population genetics of the round goby *Apollonia melanostoma* // Molecular Ecology. – 2008. – V. 17. – P. 2598–2615.
9. Poulin J., Weller S.G., Sakai A.K. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii // Diversity and Distributions. – 2005. – V. 11. – P. 241–247.
10. Frankham R. Resolving the genetic paradox in invasive species // Heredity. – 2005. – V. 94. – P. 385.
11. Smith L.D. Ch. 10. The role of phenotypic plasticity in marine biological Invasions / Eds Rilov G., Crooks J.A. // Biological invasions in marine ecosystems. Ecological Studies. Berlin; Heidelberg: Springer, Verlag. – 2009. – P. 177–202.
12. Nohara K., Kokita T., Tominaga O., Seikai T. Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in the whitegirdled goby (*Pterogobius zonoleucus*) and cross-species amplification in the serpentine goby (*P. elapoides*) // Mol. Ecol. Res. – 2009. – V. 9. – P. 610–612.
13. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
14. Слынько Ю.В., Столбунова В.В., Чеботарь С.В., Заморов В.В., Гуровский А.Н. Разнообразие гаплотипов по локусу *сyt b* мтДНК бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas)) в северо-западной части Черноморского бассейна // Генетика, 2014. – Т. 50, № 3 – С. 314–320.

MISHCHUK Ya.M.¹, SERGA S.V.¹, RADIONOV D.B.², ZAMOROV V.V.², CHUYKO V.J.², CHEBOTAR S.V.², KOZERETSKA I.A.¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre “Institute of Biology and Medicine”,

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

² Odessa National I.I. Mechnikov University,

Ukraine, 65082, Odessa, Dvorynskaya str., 2, e-mail: bio@onu.edu.ua

MICROSATELLITE LOCUS *Ame17* POLYMORPHISM FOR ROUND GOBY (*NEOGOBIUS MELANOSTOMUS*) FROM NORTHWEST BLACK SEA REGION

Aim. To identify the *Ame17* polymorphic variants for round goby *Neogobius melanostomus* from Northwest Black Sea region. **Methods.** We determined polymorphism for 102 individuals of round goby. Genotyping was performed by PCR-analysis of *Ame17* as described by Brown et al., 2008. The PCR-amplified DNA products were subjected to electrophoresis in 8 % polyacrylamide gel. **Results.** There have been identified 23 alleles. The range of repeat sizes was from 140 to 300 bp. The average heterozygosity was 0.76. **Conclusions.** There have been analyzed polymorphisms of *Ame17* microsatellite locus for round goby from Northwest Black Sea region. The highest genetic diversity at *Ame17* locus was observed for fish from the Gulf of Odessa. In terms of heterozygosity subpopulation of round goby from Bay Dzharylgach was significantly different from other localities.

Keywords: round goby, polymorphism, microsatellite loci, *Ame17*.

Висновки

Проаналізовано поліморфізм мікросателітного локусу *Ame17* бичка-кругляка Північно-Західного Причорномор'я та ідентифіковано 23 алелі. Найбільшу генетичну різноманітність за цим локусом спостерігали у риб із Одеської затоки. За показником гетерозиготності бички з Джарилгацької затоки достовірно відрізнялися від локалітетів з інших досліджених акваторій.