

**Чубик І.Ю.**

*аспірантка;*

**Чеботар С.В.**

*доктор біологічних наук, професор,*

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова*

## **МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ УГРУПУВАНЬ МІДІЙ З РІЗНИХ АКВАТОРІЙ ЧОРНОГО МОРЯ**

Двостулкові молюски роду *Mytilus* сімейства *Mytilidae* широко поширені по всій земній кулі, є об'єктами досліджень в різних дисциплінах біології і використовуються в промислі і марикультури. Рід *Mytilus* включає три загальноновизнані види: *M. trossulus* Gould, 1850, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 и *M. edulis* Linnaeus, 1758, для яких характерна генетична спорідненість та морфологічна пластичність [2; 5].

Відомо, що молекулярно-генетичні характеристики є найбільш ефективними для ідентифікації видів, а також для вивчення мінливості і дивергенції геномів як мідій, так і багатьох інших таксонів гідробіонтів [3; 4; 6].

В нашій роботі генетичний поліморфізм угруповань мідій з різних акваторій Чорного моря досліджували із застосуванням мікросателітних ДНК-маркерів. Мікросателітні послідовності (МС) використовують, як генетичні маркери з кодомінантним типом успадкування, які дозволяють контролювати генетичну різноманітність та еволюційні процеси у популяціях [1].

Мета роботи – визначення генетичного поліморфізму угруповань мідії Чорного моря за допомогою МС-маркерів.

Досліджували мідії, зібрані в різних районах північної частини Чорного моря: в Одеській затоці (у локалізації А за географічними координатами: N 46°26'28" пн. ш., E 30°46'20" сх. д.; у локалізації Б за географічними координатами: N 30°43'44.9904" пн. ш., E 46°22'2.3376" сх. д.) та біля о. Зміїний у локалізації С за географічними координатами: N 45°15'18" пн. ш., E 30°12'15" сх. д.

Геномну ДНК виділяли із різних тканин (зябер, мантиї, ноги) індивідуальних особин мідій за допомогою модифікованого методу з використанням СТАВ буферу згідно Sanghai-Marooft et al. [9] та за допомогою колонок фірми CONGEN Biotechnologie GmbH (Німеччина).

Для визначення алельних характеристик за МС-локусами були використані праймери до локусів: *Mch5* з коровим мотивом (СТGT)<sub>6</sub> та *Mch8* з коровим мотивом (CA)<sub>6</sub>, що були розроблені Ouagajjou et al. [7]. Продукти ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 7 % поліакриламідному гелі (ПААГ) та фарбували азотнокислим сріблом, згідно рекомендацій Promega [8]. Розмір отриманих фрагментів ампліфікації визначали за допомогою комп'ютерної програми «GelAnalyzer» [<http://gelanalyzer.com/index.html>] відносно маркеру молекулярної маси *pUC19 / Msp I*.

За даними літератури [7], МС-маркери *Mch5* та *Mch8* були розроблені до локусів геному мідій виду *M. chilensis*. Вперше ці маркери були використані для оцінювання поліморфізму серед 24 особин *M. chilensis*, які виловлені біля берегів Чилі, та у особин видів *M. edulis* (Данія), *M. trossulus* (Фінляндія) та *M. galloprovincialis* (Іспанія). За локусом *Mch5* у 60 особин досліджуваних видів роду *Mytilus* було детектовано 16 алелей, за локусом *Mch8* – 23 алеля. Спостережувана гетерозиготність за локусом *Mch5* варіювала від 0,250 до 0,545, за локусом *Mch8* – від 0,083 до 0,750.

В наших дослідженнях за допомогою МС-аналізу були визначені алелі за локусами *Mch5* і *Mch8* в генотипах 15 мідій із локації А, 16 мідій із локації Б, 9 мідій з локації С. Так, за локусом *Mch5* у 12 зразках мідій із локації А детектовано 10 алелів, розміри алелів варіювали від 220 п.н. до 243 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром фрагментів ампліфікації 331 п.н. і 227 п.н., їх частота була 0,20 і 0,30, відповідно. За цим локусом серед досліджених особин мідій було виявлено одну гетерозиготу і 11 гомозигот. За локусом *Mch8* було отримано результати для 15 зразків мідій з локації А, виявлено 5 гетерозигот і 10 гомозиготних організмів, детектовано 16 алелів, розміри яких варіювали від 204 п.н. до 250 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром фрагментів ампліфікації 205 п.н. (0,19), 207 п.н. (0,13) та 211 п.н. (0,13).

У 16 мідій із локації Б за локусом *Mch5* було детектовано 12 алелів, розміри яких варіювали від 204 п.н. до 250 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром 239 п.н. та 245 п.н. (з частотою – 0,17). За локусом *Mch8* виявили 15 алелів, розмір яких варіював від 246 п.н. до 299 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром 278 п.н. та 284 п.н. з частотою – 0,14. В результаті МС-аналізу мідій з угруповань Б було виявлено одну гетерозиготу за двома досліджуваними локусами.

У мідій з локації С, виловлених біля о. Зміїний, вдалося отримати результати для 9 особин за локусом *Mch8*. Так, нами було детектовано 8 алелів, розміри яких варіювали від 229 п.н. до 242 п.н. Найчастіше зустрічався алель з розміром 238 п.н. (його частота – 0,38). Лише одна мідія з цієї локації за *Mch8* була гетерозиготною.

Згідно результатів апробації двох методів виділення ДНК з різних тканин мідій та використання мікросателітних маркерів (*Mch5* та *Mch8*) при дослідженні генетичного поліморфізму мідій, як найбільш простий, швидкісний та економічний метод рекомендуємо метод з використанням СТАВ буферу. За допомогою цього методу найкраще виділяється геномна ДНК із зябер мідій, які легше гомогенізуються в лізуючому буфері.

### Список використаних джерел:

1. Duda A., Suciú R., Parashiv M. et al. Nuclear markers of Danube Sturgeons hybridization // Molecular Sciences. – 2011. – № 12. – P. 6796–6809.
2. Heath D.D., Rawson P.D., Hilbish T.J. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus spp.*) genotypes on the west coast of Canada // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 1995. – V. 52, № 12. – P. 2621–2627.
3. Hilbish T., Carson E., Plante J., Weaver L., Gilg M. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England // Marine Biology. – 2002. – V. 140, № 1. – P. 137–142.
4. Kartavtsev Y.P., Masalkova N.A., Katolikova M.V. Genetic and morphometric variability in settlements of two mussel species (*Mytilus ex. gr. Edulis*), *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis*, in the northwestern Sea of Japan // Journal of Shellfish Research. – 2018. – V. 37, № 1. – P. 103–119.
5. Kartavtsev Y.Ph., Chichvarikhin A.Y., Kijima A., Hanzawa N., Park I.S. Allozyme and morphometric analysis of two common mussel species of *Mytilus genus* (*Mollusca, Mytilidae*) in Korea, Japan and Russia waters // Korean Journal of Genetics. – 2005. – V. 27, № 4. – P. 289–306.
6. McDonald J.H., Koehn R.K. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America // Marine Biology. – 1988. – V. 99, № 1. – P. 111–118.
7. Y. Ouagajjou, P. Presa, M. Astorga, M. Perez. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: a genomic print of its taxonomic status within *Mytilus sp.* // J. Shellfish Res. – 2011. – V. 30. – P. 325–330.
8. Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. – 1999. – V.7.– p. 52.
9. Saghai-Marooof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA sepaсer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // Proc Natl Acad Sci. – 1984. – V. 81. – P. 8014–8019.