

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 577.2:575:574.5:594.3

Г.О. ЧЕБОТАР, к. б. н., доц.,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: gchebotar@gmail.com
ORCID 0000-0002-7465-4678

С.В. ЧЕБОТАР, чл.-кор. НААН України, д. б. н., проф.,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-9130-7272

Д.А. КРАСНИЦЬКА, студентка,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: dasha1krasnitskaya0308@gmail.com
ORCID 0000-0002-8274-258X

В.А. ЧЕКАЛОВ, студент,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

В.О. ГУДИМОВ, студент,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

І.Ю. ЧУБІК, аспірант,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: inna_chubik@ukr.net
ORCID 0000-0002-1443-7778

В.А. ТОПТІКОВ, к. б. н., доц.,

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: v.a.toptikov@gmail.com
ORCID 0000-0002-7881-6726

АПРОБАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗMU У ПОПУЛЯЦІЯХ *RAPANA VENOSA*

*Робота полягала в апробації різних типів молекулярних маркерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму представників виду *Rapana venosa* Valen-*

Ц и т у в а н н я: Чеботар Г.О., Чеботар С.В., Красницька Д.А., Чекалов В.А., Гудимов В.О., Чубик І.Ю., Топтіков В.А. Апробація молекулярних маркерів для визначення генетичного поліморфізму у популяціях *Rapana venosa*. *Гідробіол. журн.* 2021. Т. 57. № 4. С. 99—113.

ciennes, 1846 акваторії Чорного моря. У роботі використовували RAPD-праймери, маркери до iPBS-послідовностей, маркери гену мітохондріальної цитохромоксидази I (CO1), ITS-1 маркери до внутрішнього транскрибуємого спейсера та праймери до мікросателітних локусів. З праймерами до CO1 та ITS-1 послідовностей поліморфізму за розміром продуктів ампліфікації у зразків рапан не було виявлено. За допомогою RAPD-праймерів та маркерів до iPBS-послідовностей визначено відмінності між досліджуваними особинами, проте ці маркери мають домінантний характер успадкування, що унеможливлює визначення гетерозиготних особин. За MC-локусом Rv21 виявлено сім алельних варіантів, всі особини молюсків були гетерозиготними. За локусом Rv001 було виявлено три алельні варіанти, визначені як гетеро-, так і гомозиготні особини — носій алелю 173 п.н. Дані MC-аналізу свідчать про значно менший рівень поліморфізму особин рапан Чорного моря у порівнянні з особинами з Живого моря за даними літератури. За результатами філогенетичного аналізу не можна стверджувати, що поділ молюсків на кластери відбувся за місцем, де було їх виловлено, оскільки в обох кластерах зустрічаються особини і з району Карадагу, і з Одеської затоки. Проведений кластерний аналіз лише відображає високий ступінь поліморфізму представників чорноморської популяції рапані, а не свідчить про її поділ на декілька субпопуляцій чи окремі популяції.

Ключові слова: *Rapana venosa*, молекулярні маркери, генетичний поліморфізм.

Вселення виду *Rapana venosa* Valenciennes, 1846 змінило сучасний стан трофічних ланцюгів екосистеми Чорного моря. Рапана здатна до тривалого голодування та зміни трофічних пріоритетів залежно від обставин [5], дуже стійка до паразитарних інвазій. Різноманітність умов проживання, у тому числі багата кормова база, дозволяють припустити наявність різних популяцій виду в акваторії Чорного моря. В останній час для вивчення генетичної структури популяції *R. venosa* залучаються сучасні молекулярно-генетичні методи досліджень. Маркерні системи на основі ретротранспозонів та RAPD-аналізу активно використовуються у дослідженнях генетичного поліморфізму багатьох видів завдяки швидкості проведення ПЛР-аналізу і відносно невисокій вартості. Їх застосування не потребує конкретних знань про нуклеотидні послідовності організму-мішені. Проте інтерпретація отриманих результатів не завжди проста, наприклад через те, що RAPD-маркери поводять себе як домінантні. Це не дає можливості виявити гетерозиготні локуси, що важливо при вивченні генетичної структури популяцій. Іншою проблемою їх використання є те, що ці маркерні послідовності довільно розповсюджені по геному і пов'язати той чи інший фрагмент ампліфікації з мутацією у певному гені або з певним фенотипом дуже складно. Спряжені маркери до ділянок певних структурних генів є більш інформативними для виявлення зв'язку між алельною структурою генотипу та її фенотипічним проявом, проте використання таких маркерів можливе після визначення нуклеотидної послідовності гену.

У 2016 р. було проведено повне секвенування мітохондріального геному *R. venosa* [16], що дозволило встановити його довжину — 15271 п.н., виявити 13 білок-кодуючих генів, 21 ген транспортної РНК і два гени, що кодують рибосомну РНК. Особливостями мітохондріального геному ра-

пани є висока частка АТ-пар (69 %) і невелика кількість некодуючих регіонів (загалом 302 п.н., найбільший з яких 74 п.н.) [16].

Цьому передувала робота зі створення перших 23 мікросателітних поліморфних маркерів [6] для вивчення популяційної структури рапані за допомогою модифікації протоколу «FIASCO» [18]. У цих дослідженнях кількість алелів на локус коливалося від 3 до 17, фактична та очікувана гетерозиготність варіювала відповідно від 0,167 до 1,000 та від 0,455 до 0,924. У 2014 р. за допомогою 454-секвенування було охарактеризовано 57 поліморфних мікросателітних локусів у 30 особин *R. venosa* [17]. Кількість алелів на локус коливалась від 2 до 14. Фактична та очікувана гетерозиготність за цими локусами становила відповідно 0,127—0,919 і 0,100—1,000.

Метою нашої роботи була апробація RAPD-праймерів, маркерів до iPBS-послідовностей, маркерів гену мітохондріальної цитохромоксидази I (*CO1*), *ITS-1* маркерів до внутрішнього транскрибуемого спейсера та праймерів до мікросателітних локусів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму представників виду *R. venosa* акваторії Чорного моря.

Матеріал і методика досліджень

Матеріалом слугували особини *R. venosa*, зібрани вручну безвибірковим способом на кам'яній гряді Одеської затоки (ОЗ) у районі Малого Фонтану в 50 м від берега на глибині 5—7 м, біля мису Тарханкут (Tx), акваторії о. Зміїного (Зм), береговій зоні Татарбунарського району (Тб) та у районі Карадагу (у 2013 р.)*. Молюсків заморожували при температурі -28 °C і зберігали до аналізу. Після відтаювання їх препарували, для одного зразка брали 50 мг тканин ноги (н), слинних залоз (сл), нефридіїв (нф) і зябер (з). Концентрацію виділеної з тканин ДНК визначали на спектрофотометрі NanoPhotometr plus (Eppendorf, Німеччина).

У роботі використовували методики виділення ДНК за допомогою СТАВ (метод 1) [2], з додаванням додецилсульфату натрію (метод 2) [1], а також набори для виділення ДНК з тваринних тканин Diatom™ DNA Prep 100 («Лаборатория ИзоГен», РФ); Nucleospin® Genomic DNA from food (Macherey-Nagel, Німеччина; NS) та GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Латвія; GJ).

Для детекції поліморфізму рапані використовували RAPD праймери, iPBS-послідовності ретротранспозонів, локуси, що найбільш часто використовуються для ДНК-штрихкодування: *COI* фрагменти (порядку 600 п.н.) гену мітохондріальної цитохромоксидази I та *ITS-1* маркери до внутрішнього транскрибуемого спейсера (табл. 1), а також праймери до мікросателітних локусів *Rv 21* [6] та *Rv001* [17] (табл. 2).

ПЛР проводили згідно рекомендацій розробників праймерів: iPBS 2076 і 2080 [12], *COI* генів та *ITS-1* [19], *Rv21* [6], *Rv001* [17].

*Автори виражают подяку завідувачу Гідробіологічної станції Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова, к.б.н., доц. О.О. Ковтуну за збір матеріалу для проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Продукти ампліфікації фракціонували у 2 %-му агарозному гелі та за допомогою 7 % ПААГ. Візуалізацію продуктів ампліфікації в агарозних гелях проводили на трансілюмінаторі Molecular Imager Gel Doc XR+Imaging system (Bio Rad, Сінгапур). ПААГ фарбували AgNO_3 згідно Promega [15]. Розмір фрагментів ампліфікації розраховували відповідно маркерів молекулярної маси pUC19/Msp I та 1kb DNA Ladder i Gene Ruler ladder mix за допомогою програми GelAnalyser [11].

Дендрограму було побудовано методом незваженого парногрупово-го кластерного аналізу UPGMA у комп’ютерній програмі MEGA 7 [14] на основі даних мікросателітного аналізу, які були представлені у вигляді бінарного ДНК-профілю, як рекомендовано [3]. Мікросателітний аналіз проводили для 25 особин рапани (з 1—14, 26—35 та 37) з одеської акваторії та акваторії району Карадагу. Для статистичного підтвердження вірності дендрограмами застосовували бутстреп аналіз [9].

Результати досліджень та їх обговорення

Найбільшою складністю у роботі виявилося виділення ДНК, придатної для проведення ПЛР-аналізу. Хоча концентрація ДНК, виділеної з тканин і визначеній на спектрофотометрі NanoPhotometr plus (Eppendorf, Німеччина) була високою з задовільними показниками якості, отримати продукти ПЛР реакції вдавалося не завжди.

Таблиця 1
Послідовність праймерів, використаних у роботі

Праймер	Послідовність 5'-3'	Праймер	Послідовність 5'-3'
A-12 RAPD	TCGGCGATAG	MLCO1490 (F)	TCGACAAATCATAAAGACA TTGG
B-05 RAPD	TGCGCCCTTC	MHCO2198 (R)	TATACCTCTGGATGTCCAA AAAATCA
2076 IPBS	GCTCCGATGCCA	ITS-1 (R)	GCTGCGTTCTTCATCGATG C
2080 IPBS	CAGACGGCGCCA	ITS-1 (F)	TAACAAGGTTCCGTAGGT GAA

Таблиця 2
Праймери до МС-локусів рапани

Локус	Тип повтору	Послідовність праймера (5'-3')	T_b (°C)	N
Rv21	(TC) ₃₂	ATAGATATTGGTCAGGTATTGCC GTATTCTATAAGGAAGGGGATTT	56	17
Rv001	(CT) ₁₀ N ₇ (TC) ₁₈	TGCTCTCTCCCTCCTCTG CTTCCAGCTCGATAGGACG	56	13

При мітка. T_b (°C) — температура відпалу праймерів у ПЛР; N — кількість алелів на локус за літературними даними.

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу, концентрація ДНК залежала від методу виділення ($MS = 117201$; $df = 4$; $P = 0,001$), у той же час джерело ДНК (тканина), не мало достовірного впливу на концентрацію, так само як і взаємодія факторів «метод виділення» та «тип тканини». Набори Diatom™ DNA Pref 100 і NS дозволяли отримати ДНК достатньої якості та кількості (табл. 3), проте такі способи були дорожчими ніж два інших. Концентрація ДНК у зразках, отриманих згідно рекомендацій [1] була вище, ніж при використанні протоколу [2], тому у подальших дослідженнях використовували саме цей метод.

Відносно низьку концентрацію ДНК у зразках, виділених за допомогою набору GJ, можна пояснити недостатньою ефективністю лізису зразків лізуючим реагентом. Згідно із протоколом виділення ДНК цим набором, інкубація зразків для лізису триває 3 години, після закінчення вказаного часу у пробірках залишалися несолюбілізовані фрагменти тканини, хоча зразки, виділені за допомогою цієї методики, використовували у подальшій роботі. Загалом вважаємо, що всі випробувані методи виділення ДНК, окрім GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit, можна використовувати у дослідженнях для якісного виділення ДНК з молюсків.

Виділену ДНК вивчали за допомогою ПЛР з різними типами праймерів. При вивчені зразків рапани з популяції Одеської затоки та мису Тарханкут з праймерами до послідовності *CO1* та *ITS-1* зареєстровано фрагменти ампліфікації однакового розміру для всіх досліджуваних зразків за кожним з праймерів (рис. 1), що свідчить про відсутність поліморфізму всередині популяцій та між ними. Це може бути зумовлено певним рівнем консервативності зазначених послідовностей, що пов'язано з їх функціями і відсутністю значних делецій або інсерцій у досліджуваній ділянці геному та свідчить про необхідність проведення секвенування для виявлення одонуклеотидних замін або інших перебудов послідовності. У той же час, згідно даних [19], при дослідженні *ITS-1* регіону ампліфікували фрагменти 500—600 п.н. з різницею за довжиною послідовності близько 80 п.н. між різними видами родини Мурексовых. Але секвенування потребує додаткових фінансових витрат, тому праймери до послідовностей генів *CO1* та *ITS-1* без залучення в роботу методів секве-

Таблиця 3
Концентрація ДНК (нг/мкл) *R. venosa* при застосуванні різних методів виділення

Метод виділення ДНК	Кількість зразків	Концентрація	Стандартне відхилення
Diatom™ DNA Pref 100	15	173,6	156,4
Nucleospin® Genomic DNA from food	10	346,6	165,0
GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit	6	14,5	3,6
За методикою [2]	7	166,8	111,6
За методикою [1]	6	270,5	157,4

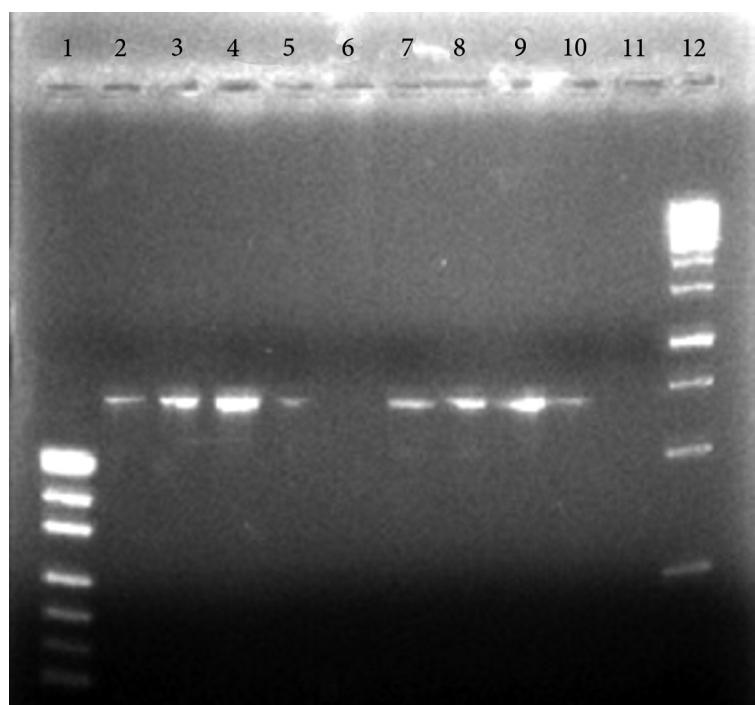


Рис. 1. Електрофорез продуктів ампліфікації з праймерами до послідовності *CO1* в 1 %-му агарозному гелі: 1 — маркер *pUC19/Msp I*; зразки з особин з Одеської затоки: 2_н, 3_н, 4_н, 6_{сл} (тканина з якої виділяли ДНК позначена нижнім індексом відповідно до розділу Матеріали та методи), біля мису Тарханкут: 5_н, 7_н, 8_н, 9_{нф}, 10_{нф}, 11_{нф}.

нування виявилися незручним інструментом для дослідження генетичного поліморфізму популяції рапани.

Наступним кроком був пошук поліморфної системи молекулярних маркерів для визначення генетичного поліморфізму особин популяції рапани. Нами було обрано RAPD праймери як мультилокусні, проте локалізація цих локусів у геномі залишається невідомою.

Апробацію довільних RAPD праймерів проводили на чотирьох зразках ДНК з *R. venosa* з Одеської затоки. Два зразки ДНК (№ 21 и 23) були виділені з тканин ноги (Н) за допомогою буферу з ДДС-На — № 21 Н^{ДДС-На} і лізуючого буферу зі СТАВ — № 23 Н^{СТАВ}, крім того, два зразки були виділені з зябрової тканини (З) тими ж методами — № 24 З^{ДДС-На} і № 22 З^{СТАВ}. Результати RAPD-аналізу зразків *R. venosa* з праймерами А-12 (А) і В-05 (Б) в 7 %-му неденатуруючому ПААГ представлено на рис. 2.

На рисунку 2 відображенено, що за допомогою RAPD праймерів А-12 (а) і В-05 (б) реєструється генетичний поліморфізм серед особин *R. venosa*, виловлених в Одеській затоці. З праймером А-12 кількість виявленіх фрагментів варіювала від 9 до 12, а з В-05 — від 5 до 7. Зразок 6 на електрофорезі (№ 22 З^{СТАВ}) відрізняється від інших наявністю додаткових фрагментів ампліфікації розміром 520 п.н. та 450 п.н., а також за праймером

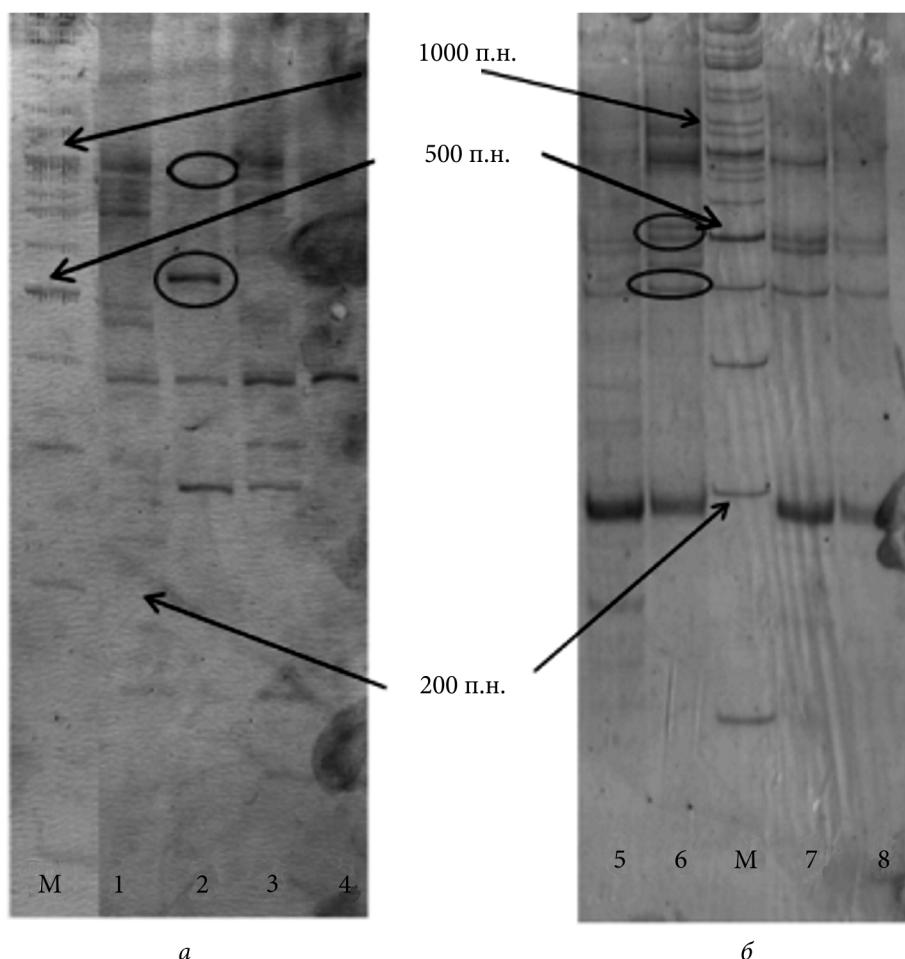


Рис. 2. Електрофорез продуктів ампліфікації ДНК *R. venosa* з RAPD праймерами А-12 (а) та В-05 (б) в 7 % неденатуруючому ПААГ: 1, 5 — № 21 Н^{ДДС-Na}, 2, 6 — № 22 З^{СТАВ}; 3, 7 — № 23 Н^{СТАВ}; 4, 8 — № 24 З^{ДДС-Na}; М — Gene Ruler ladder mix

В-05. У нього був відсутній фрагмент розміром 1000 п.н. та присутній додатковий фрагмент розміром 540 п.н.

Однак домінантний тип успадкування RAPD послідовностей унеможливлює диференціацію гетерозиготних генотипів від домінантних гомозиготних. Це ускладнює розрахунки генетичної структури популяції через значні похибки при виділенні «теоретичного» класу гетерозиготних особин та у цілому унеможливлює визначення гетерозигот у структурі популяції. Також складнощі викликає інтерпретація результатів, оскільки необхідно розглядати не лише присутність/відсутність смуг, а й інтенсивність їх зафарбованості.

Одночасно з RAPD праймерами ми використовували набір ДНК-праймерів, компліментарних до iPBS-послідовностей і розглядали можливість їх застосування як молекулярних маркерів для детекції генетич-

ного поліморфізму згідно рекомендацій [12]. iPBS-технологія ампліфікації є досить потужною «фінгерпринт»-технологією, для використання якої не потрібне попереднє знання нуклеотидної послідовності ДНК, і для диференціації генотипів на будь-якому організмі може бути використана досить мала сукупність праймерів, що дозволяє заощадити час та кошти при дослідженні видів, що не мають вагомого промислового значення або ресурси яких обмежені, а розробка маркерів на базі SNP є для них є економічно необґрунтованою [12].

За допомогою маркерів до iPBS-послідовності ретротранспозонів було зареєстровано поліморфізм серед особин *R. venosa* з Одеської затоки, акваторії о. Змійного і Татарбунарського району акваторії Чорного моря. З праймером 2076 (рис. 3) реєстрували від одного до чотирьох фрагментів розміром 1055 п.н., 764 п.н., 705 п.н., 435 п.н. і 355 п.н.

Виловлені в Одеський затоці особини 2, 3, 5 після ампліфікації з праймером iPBS-2076 характеризувалися наявністю однакових фрагментів ампліфікації розміром 1055 п.н., 764 п.н., 435 п.н. та 355 п.н., а особини 4 і 6 були відмінні. Для особини 4 були характерні фрагменти ампліфікації розміром 705 п.н., 435 п.н. і 355 п.н., а для особини 6 — 1055 п.н., 764 п.н. і 435 п.н.

Серед особин рапани, виловлених у Татарбунарському районі акваторії Чорного моря: у особини 7 виявлено фрагменти ампліфікації розміром 355 п.н., у особини 9 — 1055 п.н., 764 п.н. та 355 п.н., у особин 10 і 11 — відповідно 1055 п.н., 705 п.н., 435 п.н., 355 п.н. і 1055 п.н., 705 п.н. та 435 п.н.

Серед особин, виловлених в акваторії о. Змійного, також виявлено поліморфізм. Для особин 14 та 16 характерні фрагменти ампліфікації, ідентичні таким особинам з Одеської затоки (2, 3, 5), розміром 1055 п.н., 764 п.н., 435 п.н. і 355 п.н. У той же час особини 12 та 13 характеризувалися іншими фрагментами ампліфікації, що свідчить про генетичний поліморфізм рапани, виловленої в акваторії о. Змійного. У особини 12 виявлені фрагменти ампліфікації розміром 435 п.н. та 355 п.н., у особини 13 — 705 п.н., а у особини 15 — 1055 п.н., 764 п.н., 705 п.н., 435 п.н. та 355 п.н.

Аналіз продуктів ампліфікації з праймером 2080 (рис. 4) показав, що особини 2, 5, 7 мають одинакові фрагменти ампліфікації — 452 п.н. та 287 п.н., а для особин 3, 4, 6 характерний фрагмент 287 п.н.

Відомо, що RAPD та iPBS-послідовності ретротранспозонів розташовані у геномі довільно і тому неможливо зв'язати генетичний поліморфізм, що детектується за їх допомогою, з певними фенотипічними особливостями.

У подальших дослідженнях ми використали маркери до мікросателітних послідовностей (або simple sequence repeat (SSR)). SSR-маркери поводять себе як кодомінантні, що дозволяє визначати гетерозиготний або гомозиготний стан за мікросателітним локусом. Апробацію мікросателітних маркерів для визначення генетичного поліморфізму між субпопуляціями рапани з Одеської затоки і Карадагу проводили на зразках ДНК, виділеної з тканин ноги за допомогою лізуючого буферу з ДДС-На.

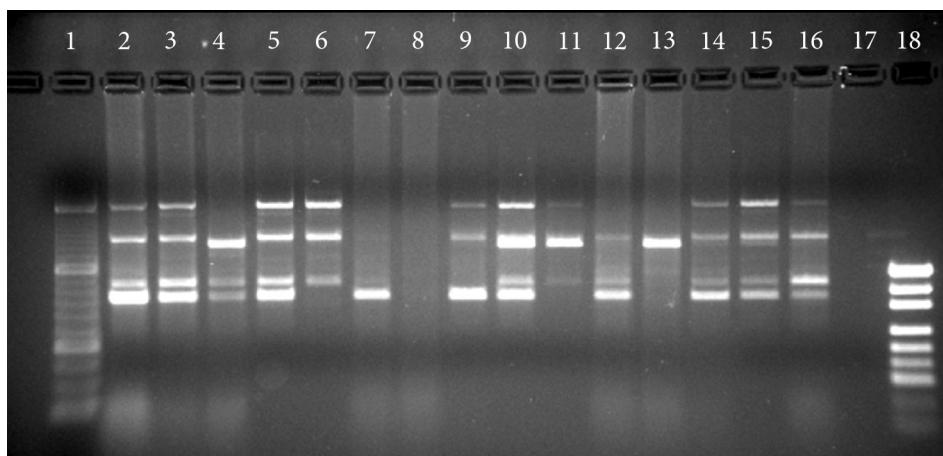


Рис. 3. Електрофорез в агарозному 2 % гелі продуктів ампліфікації, отриманих в ПЛР з праймером 2076: 1 — маркер O'Range Ruler; особини з Одеської затоки: 2, 3, 4 (ДНК виділено за допомогою набору Nucleospin) та 5, 6 (GeneJet™); у Татарбунарському районі: 7, 8, 9 (Nucleospin) та 10, 11 (GeneJet™); в акваторії о. Змійного: 12—15 (Nucleospin) та 16, 17 (GeneJet™).

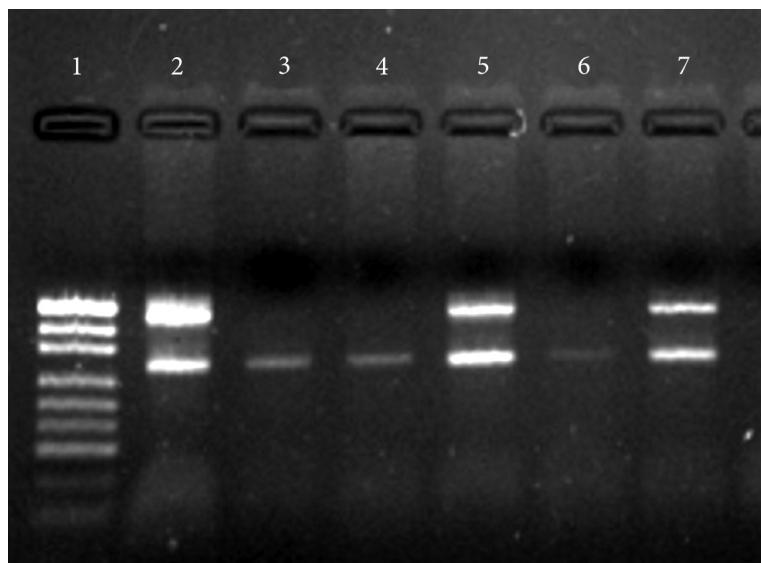


Рис. 4. Електрофорез в агарозному 2 % гелі продуктів ампліфікації ДНК виділеної за допомогою набору Nucleospin, отриманих в ПЛР з праймером 2080: 1 — маркер *pUC 19/Msp I*; зразки 2, 5 — з Одеської затоки; 3, 6 — з Татарбунарського району; 4, 7 — з акваторії острова Змійний

За локусом *Rv21* у вибірці з 26 особин детектовано сім алелів. В обох популяціях виявлено лише гетерозиготних особин (табл. 4). Таким чином, фактична гетерозиготність (H_o) склала 1,0. У той же час, згідно [6], серед 30 особин рапани, виловлених у Циндао (провінція Шаньдун, Китай), було виявлено 17 алелів, всі особини також були гетерозиготними.

Частота зустрічальності генотипів з комбінацією алелів 149—171 п. н. у особин з Одеської затоки становила 21,43 %, а серед особин з району Карадагу — 16,7 %, така ж тенденція відмічена і за комбінацією алелів 145—165 п. н. — відповідно 42,86 % і 33,33 %. Серед особин з району Карадагу 41,7 % мали комбінацію алелів 165—187 п.н., а з Одеської затоки — 35,71 %. Цікаво, що у особин з Одеській затоці не було детектовано алелів 141—161 п. н.

За локусом *Rv001* в обох популяціях були виявлені гомозиготні особини — носії алелю 173 п.н. та гетерозиготні особини ($H_0 = 0,800$). Загалом за цим локусом у 25 особин спостерігали три алельні варіанти (див. табл. 3). У той же час у дослідженнях [17], проведених на 30 особинах, детектовано 13 алелів, при цьому H_0 складала 0,500. Гомозиготних особин з алелем 173 п.н. було дещо більше серед особин виловлених у районі Карадагу, ніж в Одеській затоці — відповідно 36,4 і 7,14 %. Частота алелів 173—185 п. н. у рапан з цих двох локалітетів була близькою — відповідно 9,1 і 7,14 %. Частота алелів 173—195 п. н. і 185—195 п. н. у особин з району Карадагу була однаковою (27,3 %), а у особин з Одеської затоки вона становила відповідно 50,0 і та 35,7 %.

Таблиця 4
Алельна характеристика особин *R. venosa* з Одеської затоки та району Карадаг за мікросателітними локусами

Місце збору матеріалу / № особини	Мікросателітні локуси та алелі в п.н.		Місце збору матеріалу/ № особини	Мікросателітні локуси та алелі в п.н.	
	Одеса	<i>Rv21</i>	<i>Rv001</i>	Карадаг	<i>Rv21</i>
1	149—171*	173—195	26	165—187	173—185
2	145—165	185—195	27	165—187	173—195
3	165—187	185—195	28	145—165	173—195
4	165—187	185—195	29	165—187	173—173
5	145—165	173—195	30	145—165	185—195
6	165—187	173—195	31	141—161	173—195
7	145—165	173—173	32	145—165	185—195
8	145—165	185—195	33	145—165	173—173
9	165—187	173—195	34	149—171	173—173
10	145—165	185—195	35	165—187	185—195
11	165—187	173—195	36	165—187	—
12	149—171	173—185	37	149—171	173—173
13	149—171	173—195			
14	145—165	173—195			

П р и м і т к а. Розмір продуктів ампліфікації в п. н.

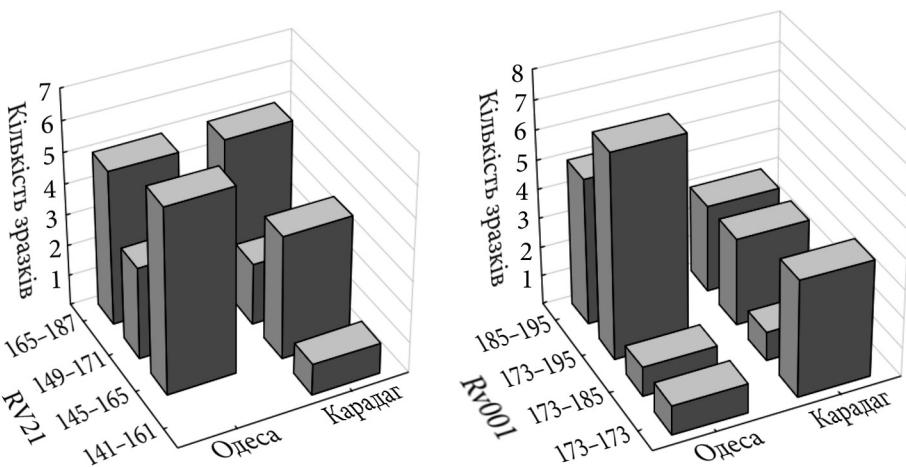


Рис. 5. Гістограма розподілу особин *R. venosa* з Одеської затоки та району Карадаг за алелями мікросателітних локусів.

Отримана дендрограма (рис. 6) (за винятком особини 36, оскільки продукти ампліфікації з праймерами *Rv001* отримати не вдалось), є невкоріненою, а кластери другого порядку згідно бутстреп аналізу відгалужуються на рівні всього 44 %, розділилася на два кластери — один, більший, склали особини з виявленими за локусом *Rv21* алелями 145—165 п. н. і 165—187 п. н., у другий увійшли особини, у яких за локусом *Rv21* було виявлено алелі 141—161 п. н. і 149—171 п. н.

Комбінації фрагментів ампліфікації 173—173 п. н., 173—187 п. н. та 173—195 п. н. за локусом *Rv001* зустрічаються в обох кластерах. Перший розділився на два підкластери на основі комбінацій за локусами *Rv21* та *Rv001*. Припускаємо, що локус *Rv21* виявився більш значимим для розділення особин *Rapana venosa*, оскільки був більш поліморфним.

Отримана дендрограма не дає можливості поділу молюсків за місцем їх існування (вилову), оскільки в обох кластерах зустрічаються особини і з району Карадагу, і з Одеської затоки. Тому проведений кластерний аналіз свідчить лише про високий ступінь поліморфізму представників чорноморської популяції рапани, а не про її поділ на декілька субпопуляцій чи окремі популяції. Значну генетичну гетерогенність і нерівномірність поселення *R. venosa* у Чорному морі можна пояснити високою інтенсивністю міграційних процесів. Наявність у Чорному морі різноспрямованих течій [8] сприяє переносу планктонних личинок рапани з однієї частини акваторії до іншої. Так, основна Чорноморська течія, що рухається зі швидкістю 0,2—1 м/с проти годинникової стрілки по всьому периметру моря, може забезпечувати пасивне рівномірне перенесення молюсків на далекі відстані.

Така точка зору добре узгоджується з даними досліджень генетичної структури *R. venosa*, отриманими шляхом аналізу ізозимних спектрів, які

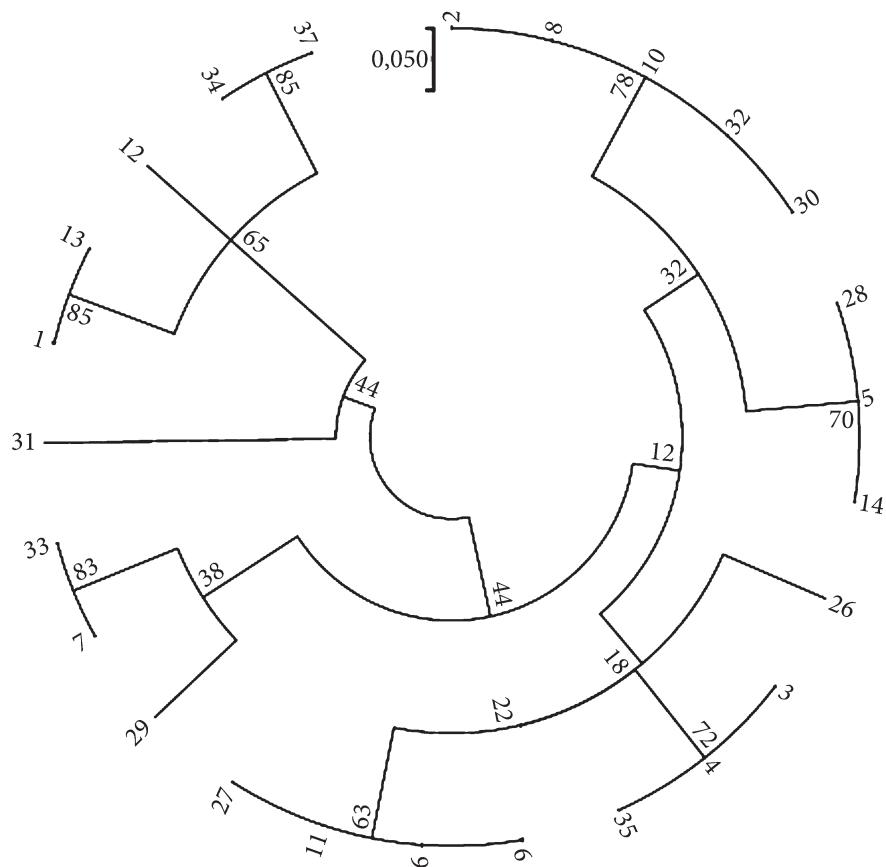


Рис. 6. UPGMA-дендrogramа генетичних взаємовідносин між генотипами особин рапани за даними аналізу двох SSR-локусів. Числа на схемі — бутстреп індекс

кодуються алелями генів різних ген-ензимних-систем цього молюска [4]. Розраховані за результатами ізозимного аналізу генетичні відстані за Неем між угрупованнями *R. venosa* виявилися досить малими, коливалися у межах від 0,008 до 0,032. Такі показники генетичної дистанції вважаються характерними для рівня локальних популяцій [7].

Висновки

В результаті роботи апробовано чотири типи молекулярних маркерів для визначення генетичного поліморфізму у популяції рапани: маркери до цільових генів, RAPD, маркери до iPBS- та мікросателітних послідовностей. Маркери до генів *CO1* та *ITS-1* виявилися неінформативними, без додаткового секвенування, для визначення генетичного поліморфізму у популяції рапани. RAPD маркери: А-12 та В-05, а також маркери iPBS-послідовностей ретротранспозонів [12]: 2076 та 2080 можуть використовуватися у дослідженнях генетичного поліморфізму, однак необ-

хідно пам'ятати про домінантний характер успадкування цих маркерів та неможливість визначення гетерозигот.

Мікросателітний аналіз з праймерами *Rv21* та *Rv001* дозволив виявити генетичний поліморфізм серед представників рапані, зібраних в Одеській затоці та у районі Карадагу. При цьому у порівнянні з особинами, виловленими у районі Ціндао (Китай), спостерігали значно менший поліморфізм за цими локусами. Молекулярні-маркери до МС-локусів *Rv21* та *Rv001* можуть бути рекомендовані для дослідження генетичної структури популяції *R. venosa* у Чорному морі.

Кластерний аналіз за результатами дослідження мікросателітних локусів у геномі рапан чорноморської популяції свідчить про високий ступінь поліморфізму у цих локусах, однак відгалуження кластерів не є вірогідним.

Список використаної літератури

1. Волков Р.А., Панчук І.І. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці, 2014. 120 с.
2. Использование ПЦР анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно-методическое руководство / под ред. Ю.М. Сиволапа. Киев, 1998. С. 24—37.
3. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одесса, 2011. 336 с.
4. Топтіков В.А., Тоцький В.М., Алексеєва Т.Г., Ковтун О.О. Популяційно-генетична структура угруповань рапані в північно-західній частині Чорного моря. *Цитологія і генетика*. 2017. Т. 51, № 4. С. 21—32.
5. Шадрин Н.В., Афанасова Т.А. Питание и распределение *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) в акватории Опукского заповедника (Восточный Крым, Черное море). *Mор. екол. журн.* 2009. Т. 8, № 2. С. 24—26.
6. An J., Yu H., Yu R. et al. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the veined rapa whelk, *Rapana venosa*. *Cons. Gen. Resources*. 2013. Vol. 5. P. 1049—1052.
7. Ayala F.G. Population and evolutionary genetics. A primer. Menlo Park : Univ. Press. California, 1982. 268 p.
8. Belevich R.R., Skipa M.I., Syberko A.V. Quantitative evaluation of mass transfer Black Sea water flows on climate data. *Ecol. Safety Coastal Shelf Zones Sea*. 2013. Vol. 27. P. 221—225.
9. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985. Vol. 4. P. 783—791.
10. Fujioka Y. Systematic evolution of radular characters in *Thaidinae* (Gastropoda: Muricidae). *Malakologia*. 1985. Vol. 31. P. 255—287.
11. GelAnalyzer. URL: <http://gelanalyzer.com/index.html> (дата звернення 22.09.2020).
12. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. Vol. 121 (8). P. 1419—1430.
13. Kool S.P. Phylogenetic analysis of the Rapaninae (Neogastropoda: Muricidae). *Malakologia*. 1993. V. 35. P. 155—259.
14. Kumar S., Stecher G. et al. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33. P. 1870—1874.
15. Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. 7. 1999. 52 p.
16. Sun X., Yang A. The complete mitochondrial genome of *Rapana venosa* (Gastropoda, Muricidae). *Mitochondrial DNA Part A*. 2016. Vol. 27(2). P. 1471—1472.

17. Sun X., Yu H., Yu R., Li Q. Characterization of 57 microsatellite loci for *Rapana venosa* using genomic next generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*. 2014. Vol. 6. P. 941—945.
18. Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11. P. 1—16.
19. Zou S., Li Q., Kong L. Multigene barcoding and phylogeny of geographically widespread muricids (Gastropoda: Neogastropoda) along the coast of China. *Marine Biotechnology*. 2012. Vol. 14. P. 21—34.

Надійшла 23.09.2020

G. Chebotar, PhD (Biol.), Assosiated Prof.,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: gchebotar@gmail.com
ORCID 0000-0002-7465-4678

S. Chebotar, NAAS Corresponding Member, Dr. Sci. (Biol.),
Prof., Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: s.v.chebotar@onu.edu.ua
ORCID 0000-0002-9130-7272

D. Krasnitskaya, Student,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: dasha1krasnitskaya0308@gmail.com
ORCID 0000-0002-8274-258X

V. Chekalov, Student,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine

V. Gudimov, Student,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine

I. Chubik, PhD Student,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: inna_chubik@ukr.net
ORCID 0000-0002-1443-7778

V. Toptikov, PhD (Biol.), Assosiated Prof.,
Odessa I.I. Mechnikov National University,
2 Dvoryanskaya St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: v.a.toptikov@gmail.com
ORCID 0000-0002-7881-6726

APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS FOR DETERMINATION OF GENETIC POLYMORPHISM IN RAPANA VENOSA POPULATIONS

The aim of the work was to test different types of molecular markers to determine the molecular genetic polymorphism of the *Rapana venosa* Valenciennes, 1846 from the Black Sea. RAPD primers, markers to iPBS sequences, mitochondrial cytochrome oxidase I (*CO1*) gene markers, *ITS-1* markers to the internal transcriptional spacer, and primers to microsatellite loci were used. The polymorphism was not detected by size of the amplification products with the primers to *CO1* and *ITS-1* loci in the rapana samples. The differences between the studied individuals were determined using RAPD primers and markers to the iPBS sequences. These markers are dominant, so it is impossible to identify heterozygous individuals by using these markers. There were detected 7 alleles at the *Rv21* MS locus,

all mollusks were heterozygous and 3 alleles were identified at the *Rv001* locus, both hetero- and homozygous individuals (carriers of 173 bp allele). The MS analysis indicates a significant less polymorphism among *R. venosa* of Black Sea compared to literature data about *R. venosa* specimens collected in the Yellow Sea. According to the results of the cluster analysis, there were not separation of mollusks into clusters according to the place where they were caught, since both clusters meet individuals from both the Karadag region and the Gulf of Odessa. Therefore, the clustered analysis shows only the high degree of polymorphism of *R. venosa* population in the Black Sea, and not its division into several subpopulations.

Keywords: *Rapana venosa* Valenciennes, 1846, molecular markers, genetic polymorphism.