

та констант активації K_{Mg} та K_{Ca} , тобто оцінити спорідненість ензиму до цих катіонів.

За проведеними розрахунками було знайдено, що V_{max} реакції гідролізу за присутності обох катіонів є майже однаковою і складає 112 та 110 нмоль P_i / млн клітин за год для Mg^{2+} і Ca^{2+} відповідно, значення K_{Mg} становило 0,37 ммоль/л, а K_{Ca} – 0,65 ммоль/л. Ці параметри узгоджуються з літературними даними, за якими екто-АТФаза різних клітин проявляє низьку афінність до Ca^{2+} і Mg^{2+} (величина K_d складає приблизно 10^{-3} моль/л) на відміну Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТФази ЕПР або плазматичної мембрани, афінність яких до кальцію є значно вищою (величина K_{Ca} лежить в діапазоні 10^{-6} моль/л) [8]. Отримані нами дані свідчать, що ензим може активуватись обома катіонами, проявляючи дещо вищу спорідненість до іонів Mg .

Отже, в результаті проведених досліджень було визначено, що даний фермент характеризується високою швидкістю гідролізу АТФ, широкою специфічністю до нуклеозидтрифосфатів, здатністю гідролізувати АДФ, але не АМФ, низькою афінністю до Ca^{2+} і Mg^{2+} . Отже за цими параметрами ензим може бути віднесений до екто-нуклеозидтрифосфатогідролаз.

Наявність екто-АТФази у тимоцитах щура ставить питання щодо фізіологічної ролі цього фермента. Оскільки було показано, що у тимоцитах щурів експресуються 7 субтипів рецепторів $P2X$ і 2 субтипи рецепторів $P2Y$ [1], однією з функцій екто-АТФази тимоцитів може бути участь у модифікації і термінації пуринергічних

сигналів шляхом гідролізу нуклеотидів (які можуть виступати лігандами до P_2 – пуринергічних рецепторів). Фермент може також бути задіяний у регуляції клітинного циклу і клітинної загибелі, оскільки АТФ, як агоніст до $P2$ рецепторів тимоцитів, може брати участь у процесах клітинної проліферації або індукувати апоптоз [1; 3]. Ще одна можлива функція – захист клітин там, де локальна концентрація АТФ може підвищуватись внаслідок специфічного вивільнення АТФ ефекторними клітинами, наприклад, цитолітичними Т-лімфоцитами, які секретиують АТФ після активації [4].

1. Glass R., Townsen-Nicolson A., Burnstock G. // Cell Tissue Res, May 1, 2000; 300(2): 295-306.
2. Hennighausen G., Hehl EM., Rychly J. Ecto-ATPase activity in rat and mouse thymocytes and cytotoxic effects of various chemical substances in vitro // Arch Toxicol Suppl, January 1, 1985; 8: 500-3.
3. Orrenius S., Jiang S., Kull B., Fredholm B. // Immunol Lett, March 1, 1996; 49(3): 197-201.
4. Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions // Int Rev Cytol, 1995; 158: 141-214.
5. Rathbun W., Betluch V. // anal Biochem, V.28. – p. 436-445, 1996.
6. Strobel R., Rosenberg M. Complementary DNA Cloning and Sequencing of the Chicken muscle Ecto-ATPase // 1 Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993; 671:487-489.
7. Wang F., Guidotti G. CD39 Is an Ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 271, No. 17, Issue of April 26, 1996. – pp. 9898-9901.
8. Ziegelhoffer A., Breier A., Dalla N.S. // Chem. Listy 94, 2000.
10. Ziganshin, AU., Zhiganshina, LE., Burnstock, DZh. Ecto-ATPases and receptors for ATP // Eksp Klin Farmakol, May 1, 1997; 60(3): 78-82.

Надійшла до редколегії 28.02.08

УДК 577.21

А. Драницина, канд. біол. наук,
Г. Телегеев, канд. біол. наук,
І. Чумаченко, студ.,
С. Малюта, д-р біол. наук

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ У ПОПУЛЯЦІЯХ ПІНГВІНІВ ДЖЕНТУ (*PYGOSCELIS PAPUA*) ТА ПІНГВІНІВ АДЕЛІ (*P. ADELIAE*)

У статті представлено результати мікросателітного аналізу популяцій пінгвінів дженту та пінгвінів Аделі. Встановлено, що мікросателітні локуси AM12 та RM6 при аналізі популяцій пінгвінів дженту виявились абсолютно мономорфними, із лише одним детектованим локусом за кожним із маркерів. При вивченні мікросателітного локусу RM3 було виявлено 2 алелі: 221 п.н. і новий алель 217 п.н., та підтверджено належність пінгвінів дженту різних островів до одного підвиду (*Pygoscelis papua ellsworthii*). Отримано специфічні для міжвидових досліджень генетичні відстані для локусу RM3 та значні генетичні відстані для локусу RM6 між пінгвінами дженту та пінгвінами Аделі з 12 колоній Антарктики.

In the present paper the results of microsatellite analysis of Gentoo and Adelie penguin's populations are presented. AM12 and RM6 microsatellite loci in populations of Gentoo penguins were absolutely monomorphic with only one allele in both populations. RM3 demonstrated two alleles presented in this locus – 221 b.p. and the new allele – 217 b.p., which has not been described for RM3 to date. We also could confirm that these two populations belong to the same subspecies (*Pygoscelis papua ellsworthii*). The obtained genetic distances were specific for interspecies analyses (RM3 locus) and significant (RM6 locus) between Gentoo penguins and Adelie penguins from 12 colonies of Antarctica.

Вступ. Навколишнє середовище Антарктики характеризується екстремальними умовами, що змінюються в широких межах. З огляду на глобальне потепління, яке впливає на генетичну структуру популяцій рослин та тварин [1], загальну чисельність особин популяцій, межі ареалу тощо, дослідження структури антарктичних популяцій є важливим завданням [2]. Пінгвіни – важлива складова антарктичної екосистеми, і на сьогоднішній день дослідження їхньої біології – одна з актуальних проблем антарктичних досліджень міжнародних спільнот, у першу чергу це стосується проблем розповсюдження видів та їхньої генетичної мінливості [3]. І якщо деякі види пінгвінів (пінгвіни Аделі (*Pygoscelis adeliae*) тощо) уже досить непогано вивчені стосовно цього питання, то ослині пінгвіни – дженту (*Gentoo*) – або Папуа (*Pygoscelis papua*), які домінують в умовах Антарктичного півострова, практично не досліджені. Таксономічний статус пінгвінів дженту не є чітко визначеним. Деякі

автори визнають існування трьох підвидів (на основі морфометричних показників): південний (*Pygoscelis papua papua*), північний (*Pygoscelis papua ellsworthii*), до даного підвиду, вважається, належать особини пінгвінів проаналізованих популяцій о. Пітерманн та о. Лівінгстон [4], та східний (*Pygoscelis papua taeniata*) [5]. ДНК мікросателіти внаслідок високої варіабельності та селективної нейтральності є широким застосуванням знаряддям у популяційних та еволюційних дослідженнях [6]. Тому метою роботи було оцінити рівень поліморфізму пінгвінів за допомогою мікросателітних маркерів та визначити таксономічний статус пінгвінів дженту.

Об'єкт та методи досліджень. Зразки крові дженту були зібрані на острові Пітерманн – 65° 10' S та 64° 10' W, поблизу Української антарктичної станції "Академік Вернадський" (колишня британська "Фарадей", перейменована 6 лютого 1996 року), яка знаходиться на острові Галіндез – 65° 15' S та 64° 16' W, в районі півос-
© Драницина А., Телегеев Г., Чумаченко І., Малюта С., 2008

трова Антарктичний; та острові Лівінгстон (поблизу Болгарської антарктичної станції "Святий Клімент Охридський", Південні Шетландські острови – 62° 38' 29" S та 60° 24' 53" W), українською командою під час 8 Антарктичної експедиції (антарктичне літо – грудень-лютий – 2003 року). Опис методичних процедур, проведених на пінгвінах дженту, розглянутий Комісією з питань біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, яка підтвердила, що матеріали дисертаційних досліджень не суперечать питанням біоетики (Протокол № 3, від 06 лютого 2007 року). Виділення ДНК відбувалося за 1) стандартною фенол – хлороформною екстракцією; та 2) за допомогою виділення ДНК із застосуванням NaCl. Для визначення кількості та якості ДНК у препаратах застосовували такі методи: попереднє визначення концентрації ДНК та її якості в агарозному гелі та спектрофотометричний.

Три мікросателіти: RM3, AM12 та RM6, ізольовані з геномної бібліотеки пінгвінів Аделі, проаналізовані на кожному із зразків ДНК пінгвінів двох островів: 115 зразків з о. Пітерманн та 102 з о. Лівінгстон, використовуючи послідовності праймерів, що були описані Роедером та співавторами [7]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 10 мкл реакційної суміші, що містила 100 нг геномної ДНК матриці, буфер для ПЛР (10 mM трис-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl ("Scientific Technologies", Болгарія)), по 250 мкМ кожного dNTP, по 2 pmoI кожного праймера (зокрема, прямий праймер був мічений флуоресцентним барвником Cy5 ("Scientific Technologies", Болгарія)), 2,25 mM MgCl₂ та 0,025 од. Taq ДНК полімерази ("Scientific Technologies", Болгарія) [5]. У реакціях було використано такі послідовності праймерів (виробництва "Amersham Pharmacia Biotech, Inc.", Швеція): RM3 – 5'-AATCAGGCTCCAAGGTCA; 5'-ATGCCAAGTGACACAAAGG; AM12 – 5'-AAAACCCCAACACAACAAAC; 5'-CCAAGAAGAGATTTGTGAG; RM6 – 5'-CAGGAGGCTTTGAGACAA; 5'-CTGTTTACATCCCGATGCA. Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали на ампліфікаторі "TouchGene Gradient", "Teche" (Англія) за таких температурних умов: ініціююча денатурація 95 °C – 5хв; далі 35 циклів: денатурація ДНК 95 °C – 30 сек; гібридизація праймерів 61 °C – 30 сек. для RM3, 63 °C – 1 хв для AM12 та 64 °C – 30 сек. (RM6); добування ланцюга 72 °C – 1 хв. Після цього проводили добування ампліфікатів при 72 °C – 5 хв [5]. Візуалізацію продуктів ПЛР проводили в 5% поліакриламідному гелі із наступним фарбуванням сріблом. Розмір алелів ампліфікованих локусів встановлювали за денатуруючих умов із 7 М сечовиною в 6% поліакриламідному гелі, використовуючи сиквенатор "ALF Express", "Pharmacia LKB" (Швеція), при 2000 В, 70 мА та 45 Вт упродовж 180 хв шляхом порівняння з двома внутрішніми стандартами – 106 та 347 п.н. Виявлені мікросателітні локуси в популяціях пінгвінів дженту сиквенують на сиквенаторі "ABI Prism", "Perkin Elmer" (США) для встановлення мікросателітних повторів. Частоти алелів локусу RM3 обраховували простим підрахунком. Для порівняння розподілення генотипових частот алелів та порівняння значень виявленої та очікуваної гетерозиготності за Харді-Вайнбергом використовували критерій відповідності χ^2 із використанням програмного пакету GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., США). Кластерний аналіз генетичних відстаней (Fst) на основі частот алелів між проаналізованими пінгвінами дженту та особинами пінгвінами Аделі з 13 популяцій [7] проводили за допомогою пакету програм MVSP software 3.1 на основі відстаней Еуклідеана (Euclidean) [8]. Репрезентативність вибірок, яка була обрахована за допомогою програмного пакету GraphPad StatMate 1.01i (GraphPad Software Inc.,

США), мала потужність $P < 80\%$ (зважаючи на те, що наше дослідження було пілотним (проводилось вперше), таку потужність можна вважати прийнятною).

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні локусу RM3 у пінгвінів о. Лівінгстон та о. Пітерманн виявлено два алелі: 221 та 217 п.н. Послідовність повтору із сиквенованого алеля – динуклеотид (CA)₁₁. Сиквеновані нами 177 п.н. локусу RM3:

```
1 aatcaggctc caaggctcagt tagatgcggt gacccacacat
caccaccacc atgcatacac
61 acacacacac acacacacacccc ataacaagga aaacaagaaa
agaagtatca gtctcacct
121 tacagaggtc agttacttag aagtgtagaa accctaaagc
ctttgtgtca ctgtcat
```

Дев'яносто із 102 особин пінгвінів дженту острова Лівінгстон були гомозиготами (221/221) [5]. Частота такого генотипу склала 0,882. Дванадцять птахів виявились гетерозиготами (221/217) із частотою генотипу 0,118. Алель 217 не був знайдений у гомозиготному стані. Частота алеля 221 була 0,941, а частота алеля 217 була 0,059. Виявлена гетерозиготність у вибірці птахів о. Лівінгстон, тобто частота гетерозиготних особин у популяції, склала 0,1176. Очікувана гетерозиготність була обрахована як 0,1110. Для даного локусу не виявлено відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,042$, $df=1$, $p=0,85$). Дев'яносто шість із 115 особин пінгвінів дженту о. Пітерманн були гомозиготами (221/221). Частота такого генотипу склала 0,835. Вісімнадцять птахів виявились гетерозиготами (221/217) із частотою генотипу 0,157. Алель 217 був знайдений у гомозиготному стані (217/217) в одній особині пінгвінів дженту, не дивлячись на його низьку частоту трапляння в обстеженій групі пінгвінів. Частота такого генотипу становила 0,008. Частота алеля 221 була 0,913, а частота алеля 217 була 0,087. Виявлена гетерозиготність у вибірці птахів склала 0,1565. Очікувана гетерозиготність була 0,1588. Для даного локусу не виявлено відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга і в популяції пінгвінів дженту о. Пітерманн ($\chi^2=0,0032$, $df=1$, $p=0,94$). Взагалі, розподіл частот алелів вірогідно не відрізнявся у двох проаналізованих популяціях ($\chi^2=0,75$, $df=1$, $p=0,39$).

У дослідженні, проведеному Роедером та співавторами на пінгвінах Аделі [7], було знайдено 6 алелів мікросателітного локусу RM3, розміром 219-231 п.н. У роботі Роедера та співавторів [7] так само, як і у нашому дослідженні, найбільша частота трапляння була в алеля 221 (0,772). Більша генетична варіація даного локусу в пінгвінів Аделі може бути поясненою більшою кількістю особин птахів у колоніях: 4000-150000 пар, що розмножуються, у порівнянні: 50-90 пар пінгвінів дженту з о. Лівінгстон, що розмножуються [9]). Така незначна кількість пар, що розмножуються, у популяції пінгвінів дженту о. Лівінгстон передбачає появу насиченого генофонду [5, 7]. Незважаючи на виявлення в нашій роботі лише двох алелів локусу RM3, важливим у ній є виявлення нового алеля – 217 п.н. Його виявлення у пінгвінів є важливим з огляду на відсутність до сьогодні відомостей про нього у особин пінгвінів дженту, ні в особин пінгвінів двох інших видів роду *Pygoscelis*: пінгвінів Аделі та бородатих пінгвінів [5, 7, 10]. Можливо, поява даного алеля є наслідком дії нового генетичного потоку генів, але це припущення не є надто вірогідним через невеликий обсяг досліджуваної колонії птахів о. Лівінгстон [9] та його тенденцію до зменшення, хоча популяція острова Пітерманн налічує біля 2000 пар, що розмножуються і, можливо, поява алеля 217 пояснюється дрейфом генів. Потрібно зважати, що пінгвінам притаманне явище стійкого

повернення до колишніх місць гніздування, що також виключає значний генетичний потік [7, 11, 12]. Найбільш вірогідно, появу алеля 217 можна пояснити дією двохступінчатого мутаційного процесу сусідніх алелів [11, 12], у той час як алель 221 є мажорним.

Отже, порівнюючи дослідження локусу RM3, проведені на пінгвінах дженту о. Лівінгстон та о. Пітерманн, можна зазначити, що при аналізі більшої групи птахів виявлено новий для пінгвінів алель 217 у гомозиготному стані. Також для популяції пінгвінів о. Пітерманн є характерними більші частоти алеля 217: 0,087 порівняно з 0,059 та вищі частоти гетерозиготного генотипу: 0,157 порівняно з 0,118. Це може бути поясненом більшим обсягом досліджуваної колонії птахів о. Пітерманн (більша кількість пар, що розмножуються).

На основі порівняння частот алелів між двома проведеними аналізами мікросателітного локусу RM3 на пінгвінах дженту о. Лівінгстон та пінгвінах Аделі (Роедер та співавтори [7]) було проведено кластерний аналіз.

Генетичні відстані між пінгвінами дженту цього острова та пінгвінами Аделі з 12 колоній Антарктики дорівнювали – $F_{st} > 0,2$, хоча між пінгвінами дженту та особинами пінгвінів Аделі, що мешкають на мисі Ройдс, було виявлено значно менше значення генетичної відстані – $F_{st} > 0,08$ внаслідок зближення значень частот алеля 221 у популяції пінгвінів дженту о. Пітерманн та колонії

птахів із мису Ройдс – 0,914 та 0,875 [7] відповідно. Можливо, така суттєва наближеність особин двох видів за частотою цього алелю може відображати не лише ідентичність походження локусу 221, а так звану гомоплазію, яка виникає через високу швидкість мутаційного процесу мікросателітів [7, 10-12]. Генетичні відстані між пінгвінами дженту острова Пітерманн та пінгвінами Аделі також із 12 колоній Антарктики дорівнювали – $0,2 > F_{st} > 0,16$. Але між пінгвінами дженту та особинами пінгвінів Аделі, що мешкають на мисі Ройдс, знов було виявлено значно менше значення генетичної відстані – $0,08 > F_{st} > 0,04$ внаслідок зближення значень частот алеля 221 в популяції пінгвінів дженту о. Пітерманн та колонії птахів із мису Ройдс – 0,939 та 0,875 [7] відповідно.

Загалом, генетичні відстані між пінгвінами дженту о. Пітерманн та о. Лівінгстон були наступними – $F_{st} < 0,04$, що підтверджує належність цих двох популяцій до одного й того самого підвиду [13]. Генетичні відстані між пінгвінами дженту двох островів та пінгвінами Аделі з 12 колоній Антарктики дорівнювали $F_{st} > 0,2$, що є характерним для міжвидових досліджень генетичної різноманітності [7, 10]. Однак між пінгвінами дженту двох островів та особинами пінгвінів Аделі, які мешкають на мисі Ройдс, також виявлено значно менше значення генетичної відстані – $F_{st} \approx 0,08$ (рис. 1).

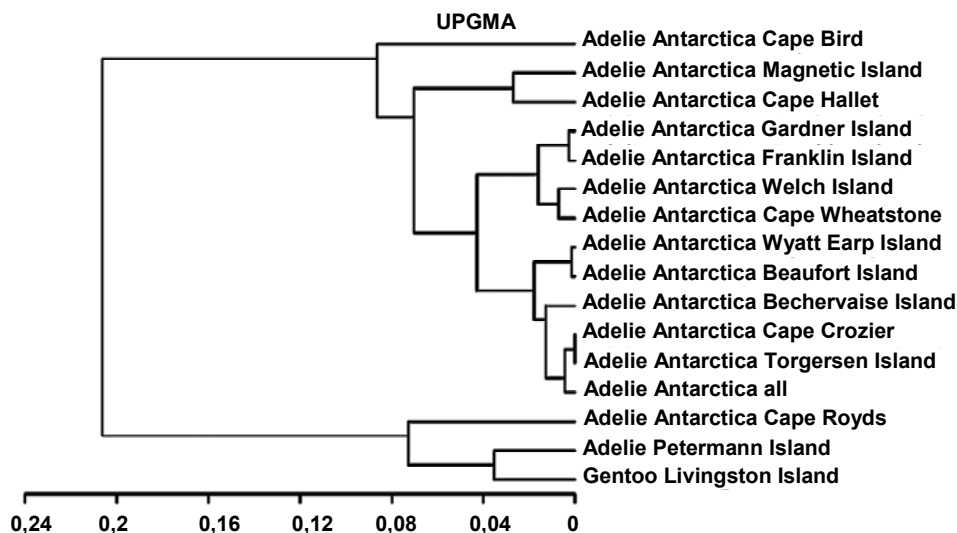


Рис. 1. Кластерний аналіз між популяціями пінгвінів дженту о. Лівінгстон, о. Пітерманн та колоніями пінгвінів Аделі з різних 13 районів Антарктики на основі порівняння частот мікросателітного локусу RM3

Примітка. Кластерний аналіз проведено за допомогою індексів генетичного підрозділення – F_{st} на основі відстаней Еуклідеана.

При аналізі мікросателітного локусу AM12 у пінгвінів Аделі (Роедер та співавтори [7]) виявлено 8 алелів, довжиною 140–154 п.н. (табл.). У нашій роботі, при дослідженні даного локусу у пінгвінів дженту о. Лівінгстон (102 особини) та о. Пітерманн (115 птахів), було знайдено лише один алель розмір якого, на жаль не було точно встановлено, проте за даними електрофореграм можна стверджувати про однаковий розмір проаналізованих алелів мікросателітного локусу AM12 в особин пінгвінів двох популяцій. Тому, через мономорфність даного локусу в популяціях пінгвінів дженту, можна стверджувати про не інформативність локусу AM12 при аналізі генетичного поліморфізму в межах виду *Pygoscelis papua*.

При дослідженні мікросателітного локусу RM6 на 217 пінгвінах дженту: 115 зразків – о. Пітерманн та 102 – о. Лівінгстон знайдено лише один алель розміром 168 п.н. Таким чином, частота трапляння даного локусу склала 100% для генофондів обох островів. Послідовність повтору із сиквенованого алеля – (GT)₆. Сиквенована нами послідовність локусу RM6 (168 п.н.):

```
1 caggaggctt tgagacaaga ctgtccttta ggcatgctgg
agcagatact gtatgcgtat
61 gtgtgtgtgt gtctgtgagt gctctgtgca gactacagat ttggtatga
agcaaacac
121 gtggcgggga gacactcca aatcagttac ctgcatcgga tgtaaac
```

Потрібно зазначити, що встановлена нами послідовність локусу RM6 є ідентичною до запропонованої в

базі даних Genbank, проте відрізняється від запропонованої Роедером та іншими [7] – (CA)₁₀, можливо через сиквенування комплементарного ланцюга [5]. Номери послідовностей у GenBank: для RM3 – AF289546, для AM12 – AF131242, для RM6 – AF289547.

Роедер та співавтори [7] при аналізі даного локусу на пінгвінах Аделі виявили 6 алелів, довжиною 168–180 п.н. Мономорфний характер мікросателітного локусу RM6 був характерним і для інших видів пінгвінів: очкового (*Spheniscus demorsus*), Магеланового (*S. magellanicus*), Галапагоського (*S. mendiculus*), великого чубатого (*Eudyptes sclateri*), Снерського чубатого (*E. robustus*) та чубатого пінгвіна (*E. chrysecome*). Більш ніж один алель був знайдений у малого пінгвіна (*Eudyptula minor*) – 3 алелі, пінгвіна Вікторії або товсто-дзьобого (*Eudyptes pachyrrhynchus*) – 2 алелі та в прегарного пінгвіна (*Megadyptes antipodes*) – 2 алелі [10]. Слід зазначити, що, за Роедером, даний маркер не давав ампліфікатів під час ПЛР на зразках деяких видів пінгвінів: королівського (*Aptenodytes patagonica*) імператорського (*A. forsteri*) та Гумбольдтова пінгвіна (*S. humboldti*) [10]. На початку нашого аналізу мікросателітного локусу RM6 у популяціях пінгвінів дженту ми зустрілися з даною проблемою, але вона було успішно вирішена за рахунок багаточисельних процедур із підбору оптимальних умов проведення ПЛР. Мономорфізм даного локусу в популяціях пінгвінів дженту свідчить про не інформативність і мікросателітного маркера RM6 для генотипування та популяційного аналізу в межах виду *Pygoscelis papua*.

При порівнянні частот алелів між двома проведеними аналізами мікросателітного локусу RM6 на пінгвінах дженту о. Лівінгстон та пінгвінах Аделі (Роедер та співавтори [7]) проведено кластерний аналіз. Генетичні відстані між пінгвінами Аделі та пінгвінами дженту були значними: $1,5 > F_{st} > 1,25$, вони є вельми вищими для міжвидових досліджень генетичної різноманітності [7, 10, 14]. Дане явище можна пояснити, головним чином, тим, що домінантний алель (168 п.н.) у популяції пінгвінів дженту є одним із найбільш рідкісних у колоніях пінгвінів Аделі, із середньою частотою трапляння 0,002 [7, 10].

Таким чином розподіл алелів в двох мікросателітних локусах: AM12 та RM6 носив мономорфний характер і при цьому відрізнявся від розподілу алелів пінгвінів Аделі, в популяціях яких Роедером та співавторами [7] був виявлений поліморфний характер розподілу. Адже, враховуючи те, що пінгвіни дженту ведуть малорухомий спосіб життя і той факт, що репродуктивний розмір цих популяцій досить незначний, можна зробити припущення, що виявлення підвищеної частоти алеля, в даному випадку, може свідчити про існування "ефекта засновник", і що саме дрейф генів відіграв значну роль у цьому процесі.

Отже, у роботі було проаналізовано три мікросателіти: RM3, AM12 та RM6, ізольованих із геномної бібліотеки пінгвінів Аделі на кожному із зразків ДНК пінгвінів дженту двох островів: 115 зразків – о. Пітерманн та 102 – о. Лівінгстон. Було виявлено незначні рівні поліморфізму в усіх обстежених особин пінгвінів дженту о. Пітерманн та о. Лівінгстон. Локуси AM12 та RM6 виявились абсолютно мономорфними, із лише одним детектованим локусом за кожним із маркерів. При вивченні мікросателітного локусу RM3 виявлено 2 алелі, один з яких (алель 217) мав дуже низьку частоту трапляння в обох популяціях пінгвінів: 5,9% о. Лівінгстон та 8,7% о. Пітерманн. Враховуючи вищезазначене, можна зробити висновок про не інформативність перерахованих маркерів для вивчення генетичної мінливості різних популяцій пінгвінів дженту та про гомогенність генетичної

структури досліджуваних популяцій. Але виявлення алеля 217 локусу RM3 у пінгвінів дженту, як уже зазначалось, є важливим з огляду на відсутність до сьогодні відомостей про нього.

Порівнюючи одержані значення F_{st} (локус RM3) для популяцій птахів ($F_{st} < 0,04$) двох островів, можна підтвердити належність даних популяцій до одного підвиду (*Pygoscelis papua ellsworthi*) [13]. Із іншого боку, виявлені відмінності в частотах алелів за трьома мікросателітними локусами між пінгвінами дженту у даній роботі та пінгвінами Аделі [7, 10] показують придатність мікросателітів RM3, AM12 та RM6 для дослідження генетичного поліморфізму на міжвидовому рівні в роді *Pygoscelis*. На основі отриманих значних генетичних відстаней ($1,5 > F_{st} > 1,25$) [14] між проаналізованими 13 популяціями пінгвінів Аделі та популяціями пінгвінів дженту двох островів за локусом RM6 можна навіть поставити деякі питання щодо традиційної таксономії (заснованої лише на анатомічних та поведінкових особливостях [9]) видів у даному роді.

Також, потрібно зазначити, що при аналізі генетичної мінливості між особинами пінгвінів двох зазначених видів за мікросателітним маркером RM3 було виявлено малі міжвидові генетичні відстані – $F_{st} \approx 0,08$ внаслідок зближення значень частот алеля 221 популяції пінгвінів дженту двох островів та колонії пінгвінів Аделі з мису Ройдс [7]. Розглядається питання про не лише ідентичність походження локусу 221, а про можливість присутності явища гомоплазії [7, 11, 12].

Застосування більш поліморфних та інформативних мікросателітних маркерів для вивчення генетичної структури пінгвінів дженту (що, у свою чергу, потребує створення бібліотеки генів пінгвінів даного виду) допоможе вивчати генетичні зв'язки у роді *Pygoscelis* та стане в пригоді, щоб з'ясувати, чи викликана гомогенність у популяціях пінгвінів дженту пізньою дивергенцією даного виду або іншими причинами відповідно до таксономічної класифікації [5].

Висновки. 1. Аналіз популяцій пінгвінів дженту за мікросателітними локусами (RM3, AM12 та RM6) виявив незначні рівні поліморфізму в усіх обстежених особин пінгвінів дженту о. Пітерманн та о. Лівінгстон, що свідчить про гомогенність генетичної структури досліджуваних популяцій та не інформативність перерахованих маркерів для вивчення генетичної мінливості різних популяцій пінгвінів дженту.

2. Локуси AM12 та RM6 виявились абсолютно мономорфними, із лише одним детектованим локусом за кожним із маркерів.

3. При вивченні мікросателітного локусу RM3 у пінгвінів дженту було виявлено 2 алелі: 221 п.н. і новий алель 217 п.н., та підтверджено належність особин пінгвінів дженту різних островів до одного підвиду (*Pygoscelis papua ellsworthi*), ($F_{st} < 0,04$)).

4. Отримано характерні для міжвидових досліджень генетичні відстані для локусу RM3 ($F_{st} > 0,2$) та значні генетичні відстані для локусу RM6 ($1,5 > F_{st} > 1,25$) між пінгвінами дженту та пінгвінами Аделі з 12 колоній Антарктики, що свідчить про придатність мікросателітів RM3, AM12 та RM6 для дослідження генетичного поліморфізму на міжвидовому рівні в роді *Pygoscelis*.

Автори висловлюють подяку В.Ф. Безрукову, А. Савову та А. Метчеві за люб'язно надані зразки крові пінгвінів дженту, а також Д. Ламберту за представлену інформацію.

1. Schmittner A. Decline of the marine ecosystem caused by a reduction in the Atlantic overturning circulation // Nature. – 2005. – Vol. 434, № 7033. – P. 628–633. 2. deYoung B., Heath M., Werner F., Chai F., Megrey B.,

onfray P. Challenges of modeling ocean basin ecosystems // Science. – 2004. – Vol. 304, № 5676. – P. 1463–1466. 3. Ritchie P.A., Lambert D.M. A repeat complex in the mitochondrial control region of Adelie penguins from Antarctica // Genome. – 2000. – Vol. 43, № 4. – P. 613–618. 4. Zentindjev P., Metcheva R., Savov A., Yankov Y., Ludvig A., Lieckfeldt D. Polymorphism of the population in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua* Aves: Sphenisciformes) from Livingston Island, South Shetlands // Bulgarian Antarctic Research. Life Science. – 2006. – Vol. 5, № 4. – P. 1–8. 5. Trakiiska E., Bichev S., Telegeev G., Dybkov M., Bezrukov V., Jankov J., Savov A. Study of three DNA microsatellite markers in *Pygoscelis papua* Penguins (Aves: Sphenisciformes) from the Livingston Island // Acta zoologica bulgarica. – 2005. – Vol. 57, № 3. – P. 333–340. 6. Neef B.D., Gross M.R. Microsatellite evolution in vertebrates: influence from AC dinucleotide repeats // Int. J. of Org. Evolution. – 2001. – Vol. 55, № 9. – P. 1717–1733. 7. Roeder A.D., Marshall R.K., Mitchelson A.J., Visagathilagar T., Ritchie P.A., Love D.R., Pakai T.J., McPartlan H.C., Murray N.D., Robinson N.A., Kerry K.R., Lambert D.M. Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adelie penguin colonies around Antarctica // Mol. Ecol. – 2001. – Vol. 10, № 7. – P. 1645–1656. 8. Bahulika R.A.,

Stanculescu D., Preston C.A., Baldwin I.T. ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah // BMC Ecol. – 2004. – Vol. 4, – P. 12. 9. Williams T.D. The Penguins. – Oxford: Oxford University Press, 1995. – P. 56–122. 10. Roeder A.D., Ritchie P.A., Lambert D. New DNA markers for penguins // Conserv. Genetics. – 2002. – Vol. 3, № 3. – P. 341–344. 11. Shepherd L.D., Lambert D.M. Mutational bias in penguin microsatellite DNA // J. Hered. – 2005. – Vol. 96, № 5. – P. 566–571. 12. Shepherd L.D., Millar C.D., Ballard G., Ainley D.G., Wilson P.R. Microevolution and mega-icebergs in the Antarctic // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102, № 46. – P. 16717–16722. 13. Savov A.S., Telegeev G.D., Bichev S.N., Trakiiska E.S., Dybkov M.V., Metcheva R., Vachev B., Legeyda A.S., Bezrukov V.F. Sex identification of Gentoo penguins using PCR with specific primers // Second Ukrainian Antarctic Meeting: Antarctic Peninsula: key region for environment change study – Kyiv (Ukraine), 2004. – P. 166. 14. Amaral J.M., Simoes A.L., De Jong D. Allele frequencies and genetic diversity in two groups of wild tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigratus*) living in an urban forest fragment // Genet. Mol. Res. – 2005. – Vol. 4, № 4. – P. 832–838.

Надійшла до редколегії 20.01.08

УДК 576.858

Ю. Рудь, асп.,
Л. Бучацький, д-р біол. наук, проф.

ІРИДОВІРУСИ РИБ

Іридовіруси – великі, ДНК-вмісні віруси, які ізолювані від комах, риб, амфібії та рептилій. Всі відомі іридовіруси риб належать до трьох родів: *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* і *Megalocytivirus* і родини *Iridoviridae*. Велика кількість іридовірусів риб, про які повідомлялось в літературі, є маловивченими, тому поки що вони не класифіковані. В цій статті розглянуті найпоширеніші іридовіруси, які спричиняють інфекції різноманітних видів риб.

Iridoviruses are large double-stranded DNA viruses which are isolated from insects, fish, amphibians and reptiles. Fish iridoviruses belong to the following three genera: *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* and *Megalocytivirus* family *Iridoviridae*. A large number of fish iridoviruses, that have been reported in literature, are insufficiently studied and consequently they are not classified. In this paper the most widespread iridoviruses which cause infections in various fish species are dealt with.

Вступ. За останні 10–15 років в умовах аквакультури та в природних водоймах було ідентифіковано велику кількість іридовірусів риб. Ізоляція цих вірусів тісно пов'язана із збільшенням обсягів ведення світової аквакультури. В умовах аквакультури іридовіруси спричиняють масову загибель риб і наносять великі збитки промисловому рибництву.

Значна кількість іридовірусів риб, про які є повідомлення в літературі, поки що не класифіковані. Для їх класифікації необхідно дослідити біологічні властивості нових ізолятів, їх відмінності від іридовірусів інших пойкилотермних тварин, які мешкають у воді.

Класифікація іридовірусів риб. Іридовіруси – це крупні, ікосаедричні, цитоплазматичні ДНК-вмісні віруси тварин [1].

За даними Міжнародного комітету по таксономії вірусів (ICTV) до складу родини *Iridoviridae* входить 5 родів: *Iridovirus*, *Chloridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* і *Megalocytivirus* [2].

Віруси риб належать до трьох родів: *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* і *Megalocytivirus* (Табл. 1). До цього часу багато нових іридовірусів ще недостатньо вивчені, не класифіковані і вважаються емерджентними (віруси, які з'явилися нещодавно, від англ. emerging). В даний час в багатьох вірусологічних лабораторіях світу проводиться ідентифікація цих вірусів, яка включає вивчення фізико-хімічних властивостей віріонів, аналіз послідовностей їх ДНК та розробку діагностикумів.

Таблиця 1. Іридовіруси риб

Організм		Вірус	Походження	Посилання
Рід <i>Lymphocystivirus</i>				
Білий морський окунь	<i>Lates calcarifer</i>	Lymphocystivirus disease virus (LCDV)	Австралія	Pearce et al., 1990
Рід <i>Ranavirus</i>				
Окунь	<i>Perca fluviatilis</i>	Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) (Red-fin perch virus)	Австралія	Langdon et al., 1986
Форель	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) (Rainbow trout virus)	Австралія	Langdon et al., 1986
Судак	<i>Stizostedion lucioperca</i>	Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)	Фінляндія	Tapiovaara et al., 1998
Сом	<i>Ictalurus melas</i>	European Catfish Virus (ECV)	Франція	Pozet et al., 1992
Сом європейський	<i>Silurus glanis</i>	European Sheatfish Virus (ESV)	Німеччина	Ahne et al., 1989
Великоротий окунь	<i>Micropterus salmonides</i>	Largemouth bass virus (LMBV)	США	Plumb et al., 1996
Гуппі	<i>Poecilia reticulata</i>	Guppy virus (GV)	США	Hedrick & McDowell, 1995
Риба-доктор	<i>Labroides dimidiatus</i>	Doctorfish virus (DFV)	США	Hedrick & McDowell, 1995
Групер	<i>Epinephelus tauvina</i>	Singapore grouper iridovirus (SGIV)	Сінгапур	Chua et al., 1994
Рід <i>Megalocytivirus</i>				
Морський лясц	<i>Pagrus major</i>	Red Sea bream iridovirus (RSIV)	Японія	Inouye et al., 1992
Морський окунь	<i>Lateolabrax sp.</i>	Sea bass iridovirus (SBIV)	Японія	Nakajima and Sorimachi, 1995
Гурами	<i>Colisa lalia</i>	Dwarf gourami iridovirus (DGIV)	Австралія	Anderson et al., 1993
Китайський окунь	<i>Sinipercha chutisi</i>	Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)	Китай	He et al., 2000
Групер	<i>Epinephelus sp.</i>	Taiwan grouper iridovirus (TGIV)	Тайвань	Chao et al., 1997