

тонинско-зозуленецких карпов и изучена степень фенотипической изменчивости некоторых количественных признаков рыб. Наблюдается преобладание фактического уровня средней гетерозиготности по всем локусам по сравнению с ожидаемым у исследованных карпов.

GENETIC AND EXTERIOR PECULIARITIES OF UKRAINIAN SCALED AND FRAMED CARPS OF ANTONINSKY-ZOZULENETS TYPE

T. Nagornyuk, O. Oleksienko, S. Tarasjuk

The complex analysis of genetic structure and exterior indexes of ukrainian scaled and framed carps has been performed. There were used eight genetic-biochemical systems of blood and detect breedspecificity peculiarities of genetic structure of Antoninsky-Zozulenets carps and studied the degree of fenotype variation some quantitative feature of fish. It is observed predominance of actual level of average heterozygosity by every locus comparatively with expected heterozygosity for investigated carps.

УДК 639.3.032:575.15

ВИКОРИСТАННЯ ISSR-PCR МЕТОДУ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ПОПУЛЯЦІЙ САЗАНА АМУРСЬКОГО

С.І. Крась, О.В. Залоїло, А.Е. Маріуца, С.І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН

Проведено дослідження особливостей генетичної структури популяції амурського сазана зі стада, що утримується у рибцеху Конотоп ВАТ Сумирибгосп. ISSR-PCR аналіз у рибництві є простим і відносно недорогим методом, який може бути використаний для вивчення генетичної мінливості в майбутньому. Оптимізований ISSR-PCR метод може послужити ефективним інструментом для подальших популяційно-генетичних досліджень стад амурського сазана.

Популяційно-генетичні дослідження у галузі сучасного рибництва набувають пріоритетного значення при веденні племінної роботи у господарствах. Їх метою є вивчення структури та динаміки генофонду; процесів, які виникають у цих популяціях; генетичних наслідків різних типів схрещувань; впливу штучного добору на спадкові ознаки організму; значення чинників довкілля для розвитку ознак тощо. Вони відіграють провідну роль у сучасних дослідженнях, реально допомагаючи вирішувати багато важливих актуальних теоретичних і практичних проблем селекції та генетики [1].

Дослідження генетичної структури риб сприяють ефективному відбору плідників із метою подальшого їх використання при отриманні гібридного потомства від коропа та сазана. Гібридизацію широко застосовують у рибництві завдяки легкому схрещуванню риб у межах виду,

використанню штучного осіменіння при заводському розведенні, а також значній плодючості риб, що дозволяє отримувати гібриди у масових кількостях із необхідними комбінаціями генів.

У сучасних дослідженнях генетичної структури здебільшого використовують підходи ідентифікації поліморфізму на рівні ДНК [2, 3]. У селекційно-племінній галузі рибництва для встановлення особливостей генетичної структури груп риб все частіше застосовують високополіморфні молекулярно-генетичні маркерні системи за використання ПЛР [4, 5]. Популярність цих методів обумовлена, насамперед, можливістю проведення адекватного оцінювання як міжпородної, так і внутрішньопородної мінливості досліджуваних тварин. Саме застосування у дослідженнях значної кількості маркерів при жорсткому відборі особин із унікальним поєднанням

ознак є основним шляхом для вивчення можливих взаємозв'язків між різними морфологічними системами на рівні ДНК [6, 7].

Одним із методів, який дозволяє, до певної міри, провести аналіз генетичної структури, оцінку генетичної різноманітності популяцій і ступеня інбредності, оцінку генетичних відстаней між лініями, породами і популяціями тварин, філогенетичних взаємовідносин, є метод за використання ISSR-PCR аналізу. Для ISSR-маркерів використовують праймери, комплементарні до мікросателітних повторів, які мають на одному із кінців послідовність з 2–4 довільних нуклеотидів. За допомогою такого підходу можна ампліфікувати фрагменти ДНК, що перебувають між двома близько розташованими послідовностями, які вважаються унікальними. У результаті одержують значну кількість видоспецифічних паттернів ПЦР-продуктів, представлених дискретними смугами на електрофореграмі [8, 9]. Враховуючи, що ISSR-метод має високу відтворюваність і не потребує інформації про нуклеотидні послідовності, його можна з успіхом застосовувати для виявлення внутрішньовидової генетичної мінливості та ідентифікації популяцій чи ліній [10, 11].

Очевидно також, що і розробка генетично обґрунтованих програм для збереження, поліпшення і раціонального використання генофондів риб неможлива без глибоких досліджень особливостей їхніх генетичних структур. Такі дослідження є також основою визначення ймовірності прояву того чи іншого стану ознаки у майбутніх нащадків. З метою вивчення внутрішньопопуляційної генетичної консолідації та пошуку генетичних відмінностей і з'ясування можливого впливу на її генетичну структуру умов розведення в роботі виконано порівняльний аналіз розподілу фрагментів ДНК у групи сазана амурського за використання ISSR-методу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженнях використовували особин амурського сазана зі стада, що утримується у рибецеху Конотоп ВАТ Сурибгосп. Зроблено проміри і відібрано зразки крові з хвостової вени у 32 особин

сазана (племінне ядро плідників 7-річного віку). Як консервант застосовували гепарин у розрахунку 25 МО на 1 мл крові. Відібрану кров фракціонували центрифугуванням впродовж 10 хв при 3,5 тис. об/хв. Отримані фракції плазми крові, лейкоцитів та еритроцитів фасували по епендорфам, заморожували і зберігали за температури -18°C . Очищення ядерної ДНК проводили із допомогою наборів "Diatom DNA Prep 100" за запропованою виробником методикою.

Специфіку генетичної структури у сазана Амурського досліджували за ISSR-PCR методикою виявлення поліморфізму фрагментів ДНК.

Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували праймери з наступними послідовностями: $(\text{CTC})_6\text{C}$, $(\text{AGC})_6\text{C}$, $(\text{AGC})_6\text{G}$, $(\text{GAG})_6\text{C}$, $(\text{ACG})_6\text{G}$. Підбір праймерів проводили емпірично. ПЛР здійснювали за допомогою стандартного набору для проведення полімеразної ланцюгової реакції "GenePak PCR Core".

Після проведення 35 циклів ПЛР 10 мкл суміші аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі. Візуалізацію проводили на транслюмінаторі в УФ світлі з фіксуванням електрофореграм цифровою камерою. Розмір ампліконів розраховували відповідно до розподілу фрагментів маркерної ДНК в агарозному гелі.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлення поліморфізму ДНК відібраних об'єктів досліджень проводили шляхом аналізу спектра отриманих ампліконів. Для одержання матричного спектра в ISSR-PCR методиці використано праймери, структура яких дозволяла оцінити гетерогенність представленої популяції (чотирискладові праймери містили 1 якір і 3 тринуклеотиди).

На одержаній електрофореграмі (рис. 1, 2) спостерігались спектри, що містили специфічні паттерни ампліконів, їх кількість коливалась в інтервалі від 3 до 10 дискретних смуг.

Така вузькодіапазонна варіабельність свідчить про те, що високий ступінь поліморфізму притаманний не всім локусам, які можна було дослідити з допомогою обраних нами праймерів.

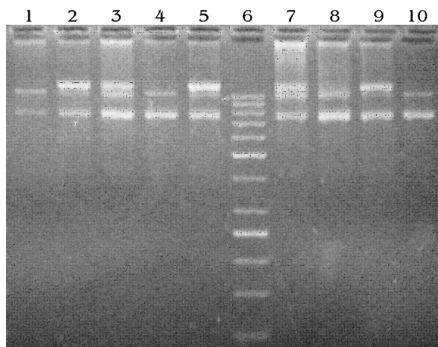


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами (СТС)₆C у сазана амурського: доріжки № 1–5, № 7–10 — особи групи; № 6 — маркер молекулярної маси

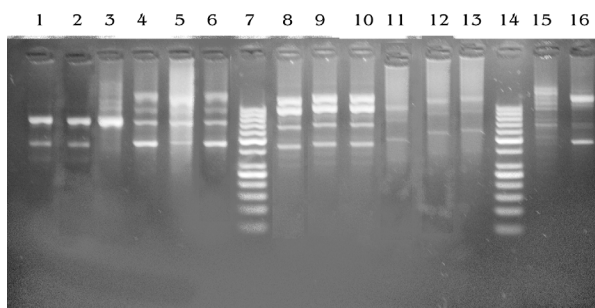


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами у сазана амурського: доріжки № 1–3 — праймер (СТС)₆C; № 4–6 — праймер (AGC)₆C; № 8–10 — праймер (AGC)₆G; № 11–13 — праймер (GAG)₆C; № 15–16 — праймер (ACG)₆G; № 7, 14 — маркер молекулярної маси

Одержані спектри оцінювали на гетерогенність зразків. Праймери (СТС)₆C і (ACG)₆G давали однаковий діапазон молекулярних мас ампліконів (1500–350). Дещо меншу межу розподілу демонстрували праймери (AGC)₆C і (AGC)₆G (1200–450 та 1100–300 нуклеотидів відповідно). Найменша межа розподілу спостерігалась при використанні праймеру (GAG)₆C — 1100–600 нуклеотидів.

Одержані паттерни ампліконів представлені як мажорними (чіткі), так і міnorними (більш розмиті) смугами. За однакової кількості копій повторностей у геномі вираженість коротших фрагментів характеризується меншою інтенсивністю світіння. Ця особливість є причиною виникнення міnorної смуги. Таким чином, у аналізі спектрів враховували залежність інтенсивності світіння як від кількості копій, так і від розміру амплікона. Причому, для праймера (СТС)₆C відмічалось 4 мажорних та 5 міnorних ампліконів, для праймера (AGC)₆C — 4 мажорні, для праймера (AGC)₆G — 4 мажорні та 6 міnorних, для праймера (GAG)₆C — 3 мажорні та 2 міnorні смуги, а для праймера (ACG)₆G — 3 мажорних та 7 міnorних.

Відомо, що представники корошових, зокрема лускатий короп, характеризуються відсутністю внутрішньопопуляційної варіабельності електрофоретичних спектрів ISSR-PCR ампліконів [12]. Як бачимо, наші дослідження також не показали суттєвої мінливості таких спект-

рів при використанні даних праймерів у амурського сазана, а отже, доводять високий ступінь внутрішньопопуляційної консервативності.

Залежно від обраного праймеру, мікросателітні послідовності ядерної ДНК особин амурського сазана, використаного у наших дослідженнях, демонстрували дещо різний ступінь внутрішньопопуляційної ідентичності. За літературними даними для індивідуального маркування необхідно використовувати такі праймери, за якими поліморфізм можна встановити лише на рівні особи [13]. Очевидно, що такі праймери мають бути високо специфічними. Праймери, використані у нашій роботі, є цілком придатними для аналізу генетичної структури на рівні популяції або для маркування в межах вибірки.

ВИСНОВКИ

Загалом наші дослідження та дані, отримані при застосуванні різних праймерів, свідчать про те, що в дослідженій групі сазана існують суттєві відмінності. Використані послідовності ядерної ДНК, що повторюються, можуть бути застосовані для внутрішньопопуляційного генотипування. Зважаючи на відносну простоту ISSR-PCR методу та незначні витрати для проведення досліджень із його використанням, такий аналіз є перспективним методом при дослідженні популяцій риб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Snyder M. P., Kimbrell D., Hunkapiller M. // Nucl. Acids Res. — 1982. — V. 79. — P. 7430.
2. Wallace R.B. DNA recombinant technology. Boca Raton (Fla.) // CRC press, 1983. — 212 p.
3. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Higuchi R. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. — 1988. — V. 239, № 2. — P. 487–91.
4. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // Chromosoma. — 2000. — V. 109. — P. 365–371.
5. Сулимова Г.И. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 9. — С. 1294–1299.
6. Buntjer J.B., Otsen M., Nijman I.J. et al. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting // Heredity. — 2002. — V. 88, № 1. — P. 46.
7. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification // Genomics. — 1994. — V. 20. — P. 176–183.
8. Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of Inter simple-sequence repeats // Theoret. Appl. Genet. — 1994. — V. 89. — P. 998–1006.
9. Neve G., Meglecz E. Microsatellite frequencies in different taxa // Trends Ecol. Evol. — 2000. — V. 15, № 9. — P. 376–377.
10. Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism in the Genus *Oryza* // Theor. Appl. Genet. — 2000. — V. 100. — P. 1311–132.
11. Irzykowska L., Wolko B., Świącicki W.K. The genetic linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular, biochemical and morphological markers // Pisum Genetics. — 2001. — V. 33. — P. 13–18.
12. Городная А.В., Мариуца А.Э., Тарасюк С.И. Исследование информативности ДНК маркеров при изучении специфики генетической структуры сазана амурского // Рыбоводство и рыбное хозяйство. — 2011. — № 3. — С. 46–51.
13. Городна О.В., Грициняк І.І., Тарасюк С.І. Особливості виявлення поліморфізму у коропових за використання ДНК маркерів. // Рибне господарство. — 2009. — Вип. 66. — С. 55–59.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ISSR-PCR МЕТОДА ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИИ САЗАНА АМУРСКОГО

С.И. Крась, О.В. Залоило, А.Э. Мариуца, С.И. Тарасюк

Исследованы особенности генетической структуры популяции амурского сазана из стада, содержащегося в рыбцехе Конотоп ВАТ Сумырыбхоз. ISSR-PCR анализ в рыбоводстве — это простой и относительно недорогой метод, который может быть использован для изучения генетической изменчивости в будущем. Оптимизированный ISSR-PCR метод может послужить эффективным инструментом в дальнейших популяционно-генетических исследованиях стад амурского сазана.

USE OF ISSR-PCR OF METHOD FOR GENOTYPING POPULATION OF AMUR CARP

S. Kras, O. Zaloilo, A. Mariutsa, S. Tarasjuk

The features of genetic structure of population of Amur carp are investigational from a herd, contained to fish farm Konotop of “Sumyrybkhosp”. ISSR-PCR analysis in a fish-farming — it outage and in relation to inexpensive method which can be used for the study of genetic changeability in the future. The optimized ISSR-PCR method can serve an effective instrument in further population — genetic researches of herds of Amur carp.