
СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 597.443:597-115:639.3.032

ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ У ДОСЛІДЖЕННЯХ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ПЛЕМІННОГО МАТЕРІАЛУ ВЕСЛОНОСА (*POLYODON SPATHULA* (WALB.))

О.М. Третьак, І.І. Грициняк, С.І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН

Проведений аналіз генетичної мінливості веслоноса з використанням ДНК-маркерів у племінному стаді, що відтворюється і вирощується в рибгоспі “Гірський Тікич” Черкаської області. Виявлено високу ступінь поліморфізму за окремими мікросателітними локусами. Отримані результати аналізу ДНК-маркерів свідчать про можливість їх використання в подальшому для паспортизації, ідентифікації та з’ясування походження племінних груп веслоноса.

Одним із ключових завдань на шляху організації масового відтворення та широкомасштабного виробництва посадкового матеріалу веслоноса є необхідність нарощування чисельності його ремонтно-маточних стад. Це в свою чергу спонукає до всебічної оцінки наявного в Україні вихідного племінного фонду веслоноса, зокрема шляхом вивчення генетичної структури локальних племінних груп інтродуцента [1–3].

У багатьох випадках варіабельні ДНК-маркери дають змогу виявити генетичні відмінності, не розпізнані методами електрофорезу білків [4]. У зв’язку з відсутністю в Україні робіт з питань вивчення особливостей генетичної структури веслоноса з використанням ДНК-технологій нами було проведено аналіз генетичної мінливості цього інтродуцента із використанням ДНК-маркерів у племінному стаді, що відтворюється і вирощується в рибгоспі “Гірський Тікич” Черкаської області.

Слід відмітити, що досліджень цього спрямування, проведених на популяціях веслоноса вкрай мало, окрім робіт присвячених вивченню популяцій з нативного ареалу [5]. Авторами на підставі аналізу п’яти поліморфних мікросателітних локусів описаних Е.Ж. Heist зі співавторами (2002) проведені дослідження груп веслоноса з 12 географічних точок.

Проведена попарна оцінка генетичної гетерогенності між географічними зразками показала генетичну гетерогенність. Генетичні відстані були незначними і практично відповідали географічному розміщенню, окрім географічно ізольованих популяцій. Специфіка окремих популяцій характеризується зниженням гетерозиготності, можливо, через низьку ефективну чисельність популяції і певну генетичну ізоляцію. Автори розглядають розподіл генетичних варіацій у веслоноса як один з історично високих рівнів потоку генів між популяціями.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Відбір зразків крові у риб здійснювали стандартним способом з хвостової вени, дотримуючись правил асептики та антисептики.

Виділення геномної ДНК з цільної крові риб (у кожній групі $n = 29-30$) проводили за допомогою набору реагентів “Diatom DNA Prep 100”. Концентрацію та чистоту препаратів ДНК перевіряли за допомогою спектрофотометра. Для проведення PCR використовувалися термоциклери фірми “ДНК-технологія” (Росія), “Eppendorf” (Німеччина). Аналіз поліморфізму та успадкування алейних варіантів анонімних послідовностей геномної ДНК за низкою мікросателітних праймерів проводився з використанням

PCR-ISSR аналізу [6]. Як праймери використовували фрагменти мікросателітних локусів з тринуклеотидною коровою та одонуклеотидною якірною ділянками — $(AGC)_6C$; $(AGC)_6G$; $(ACG)_6G$. Для визначення розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярних мас Step Ladder DNA S7025 (SIGMA). Візуалізацію молекул ДНК здійснювали в ультрафіолетовому випромінюванні при фарбуванні бромистим етидієм (0,5 мкг/мл гелю).

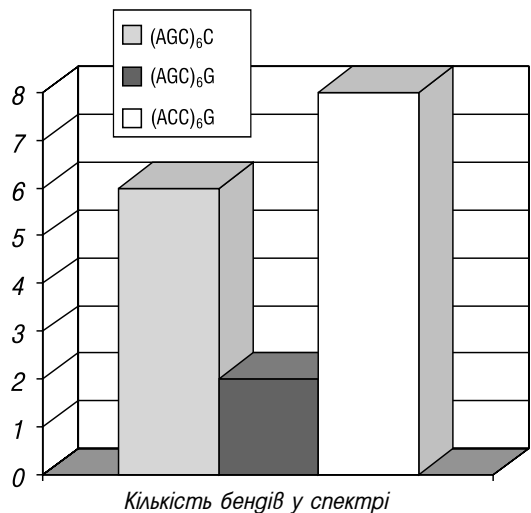
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виявлення характеристик генотипу інтродукованого матеріалу вєслоноса та методів його подальшої генетичної трансформації з метою поліпшення господарсько цінних ознак та пристосування до умов вирощування були використані трикорові мотиви мікросателітів, як праймери ампліфікації ділянки геному між їхніми інвертованими повторами (метод ISSR-PCR). Суть методу полягає у застосуванні мікросателітних локусів як ділянок відпалу праймерів і ампліфікації ділянок, що знаходяться між їх інвертованими повторами. Праймери складаються із повторюваної послідовності, наприклад, $(CA)_n$ “якірної” ділянки на 5-ти чи 3-х кінцях $(CA)_9G$ або $(CA)_8C$, що визначають місце відпалу праймера. Такий підхід збільшує точність відпалу, відтворюваність ампліфікованих фрагментів і зменшує їх “анонімність”. Цей метод передбачає ампліфікацію ділянок, які розташовані у різних частинах геному, і, в залежності від відстані розташування інверсій, отримання бендів різної довжини. У дослідженні використовували два праймери, які різнились лише якірною частиною, а корову мали однаковою і третій мав інший коровий мотив — $(AGC)_6C$; $(AGC)_6G$; $(ACC)_6G$. Ці послідовності нами були взяті в роботу для виявлення поліморфізму мікросателітних праймерів у вєслоноса за аналогією з характерними праймерами тварин, і вони є інформативними для проведення популяційних досліджень генетичної структури риб, що належать до ряду осетроподібних.

Не за всіма локусами, досліджуваними за допомогою вказаних праймерів, виявлено високу ступінь поліморфізму. Спектри отриманих ампліконів нараховували від двох до восьми бендів (рисунок).

У відповідності до використаного праймеру, отримано специфічні спектри ампліконів, які знаходились у межах $(ACG)_6G$ — 1500–380 п.о. та $(AGC)_6C$, $(AGC)_6G$ — 1200–450 та 1150–300 п.о., відповідно (таблиця).

Найменш поліморфним був локус за спектром ампліконів отриманих при використанні праймеру $(AGC)_6G$. Найбільш поліморфним виявився локус за спектром ампліконів отриманих при використанні праймеру $(ACC)_6G$. За окремими праймерами виявлено підвищений рівень поліморфізму. За використання праймеру $(AGC)_6G$ частка поліморфних локусів складала 15% — найменшу серед



Спектри отриманих ампліконів у вєслоноса з господарства “Гірський Тікич”

Характеристика спектру ампліконів отриманих методом ISSR-PCR у вєслоноса

Послідовності праймерів	Межі спектру ампліконів, (п.о.)	Частка поліморфних локусів, %
$(AGC)_6C$	1200–450	26
$(AGC)_6G$	1150–300	15
$(ACC)_6G$	1500–380	32

використаних праймерів. Тобто, з моменту інтродукції в Україну та подальшого розведення в “собі”, стадо веслоноса, що відтворюється у господарстві “Гірський Тікич” набуло деякої специфіки генетичної структури. За літературними даними з виявлення поліморфізму генетико-біохімічних систем веслоніс має низькі показники гетерозиготності за важливими ферментними системами [7] та характеризується певними фенотиповими відмінностями. Тобто методи генетико-біохімічних досліджень не дають чіткої відповіді на формування відмінностей серед особин популяції. ДНК-маркери надають можливості на рівні генів виявити специфіку генетичної структури стада.

Ми мали змогу охопити дослідженням генотипи риб тільки за трьома праймерами — $(AGC)_6C$; $(AGC)_6G$; $(ACC)_6G$ (мінімальна кількість), проте й такий підхід дав змогу виявити в досліджуваному стаді риб поліморфізм геному на рівні $\approx 24\%$. Чим більше в дослідження взято різних мотивів мікросателітів, тим більша частина геному перекривається маркуванням. Тобто, генетична структура виду накопичує потенціал мінливості за анонімними ділянками, а не структурними генами.

Проте, імовірно, вони відіграють певну роль у пристосуванні виду до умов існування та забезпеченні його збереження та відтворення. Отримані дані аналізу ДНК-маркерів та підтвердження їх високopolіморфності свідчать про можливість їх використання для паспортизації, ідентифікації та підтвердження походження племінних груп веслоноса.

ВИСНОВКИ

Виявлені специфічні групи алелей дають змогу ідентифікувати наявні в Україні племінні стада веслоноса. Розвиток використаних методів, при підборі зручних ядерних маркерів, сприятиме проведенню об'єктивних популяційних досліджень на великих вибірках без застосування відносно дорогих методів тотального секвенування великих ділянок геному. Доцільно також продовжити дослідження з пошуку мікросателітних локусів з високими показниками інформаційної цінності, які дадуть змогу проводити поглиблені популяційні дослідження. Розробка панелі унікальних алелей для племінних стад веслоноса з рибницьких господарств України дасть змогу створювати молекулярні інструменти потрібні для визначення походження посадкового матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Третяк О.М. Рибницько-біологічні основи формування та експлуатації племінних стад веслоноса в умовах інтродукції / О.М. Третяк // Рибогосподарська наука України. — 2009. — № 3. — С. 4–20.
2. Третяк О.М. Система науково обґрунтованого розвитку аквакультури веслоноса в Україні / О.М. Третяк // Рибогосподарська наука України. — 2010. — № 2. — С. 3–25.
3. Третяк О.М. Аналіз генетичної структури племінних груп веслоноса за окремими генетико-біохімічними системами / О.М. Третяк, С.І. Тарасюк // Рибогосподарська наука України. — 2011. — № 1. — С. 50–57.
4. Smith P. Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean / P. Smith, M. McVeagh // J. Fish Biol. — 2000. — Vol. 57. — P. 72–83.
5. Heist E.J. Rangewide Genetic Structure in Paddlefish Inferred from DNA Microsatellite Loci / E.J. Heist, A. Mustapha // Transactions of the American Fisheries Society. — 2008. — Vol. 137, Iss. 3. — P. 909–915.
6. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. — 1994. — Vol. 20. — P. 176–183.
7. Low genetic variability in paddlefish populations / D.M. Carlson, M.K. Kettler, S.E. Fisher [et al.] // Copeia. — 1982. — № 3. — P. 721–725.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПЛЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА ВЕСЛОНОСА (*Polyodon spathula* (Walb.))

А.М. Третяк, И.И. Грициняк, С.И. Тарасюк

Проведен анализ генетической изменчивости веслоноса с использованием ДНК-маркеров в племенном стаде, которое воспроизводится и выращивается в рыбхозе “Горный Тикич”

Черкасской области. Выявлено высокую степень полиморфизма за отдельными микросателлитными локусами. Полученные результаты анализа ДНК-маркеров свидетельствуют о возможности их использования в дальнейшем для паспортизации, идентификации и выяснения происхождения племенных групп веслоноса.

**USE OF DNA-MARKERS IN STUDIES OF GENETIC STRUCTURE
OF PADDLEFISH PEDIGREE MATERIAL
(*Polyodon spathula* (Walb.))**

O. Tretyak, I. Hrytsynyak, S. Tarasjuk

Analysis of paddlefish genetic variability with the use of DNA-markers in pedigree stock, which is reproduced and reared in the fish farm “Gornyi Tikich” of Cherkassy region, has been analyzed. It was found high degree of polymorphism by individual microsatellite loci. The obtained results of DNA-markers indicate about possibilities of their use further for certification, identification, and clarification of origin of paddlefish pedigree groups.

УДК 597.554.3:621.59

**ВИКОРИСТАННЯ КОБАМАМІДУ І ПЛАЗМИ КРОВІ
СРІБНОГО КАРАСЯ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ
СПЕРМИ КОРОПА**

О.Л. Безусий, В.О. Черепнін

Інститут рибного господарства НААН України, м. Київ

*Представлені результати вивчення різновікових груп українських порід коропа, отриманих з використанням сперми, кріоконсервованої із кріозахистними розчинами, модифікованими кобамамідом та плазмою крові срібного карася (*Carassius auratus gibelio*), що попередньо зазнав впливу холодового шоку.*

Використання замороженої сперми дозволяє значно підвищити економічну ефективність племінних заводів і репродукторів, знизити вплив інбредної депресії в локальних стадах елітних плідників, урізноманітнити та розширити роботи генетико-селекційного і племінного напрямів, що, безумовно, дозволить поліпшити генетичну різноманітність і рибницькі якості цінних видів риб у найближчій перспективі.

Практика наукових досліджень кріоконсервування сперми риб пов'язана з пошуком нових способів та хімічних агентів для модифікації кріозахистних розчинів, з метою покращення як кількісних так і якісних вітальних характеристик розмороженої сперми. Крім того в сферу наукового інтересу потрапляє вивчення впливу процесу заморожуван-

ня — дефростації на якість отриманої молоді та, надалі, різновікових груп ремонту і плідників.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕННЯ**

Матеріалом даних досліджень слугували сперма плідників, ембріони, личинки, цьоголітки та дволітки українських порід коропа.

Гормональна стимуляція плідників коропа з метою отримання від них сперми проводилась за допомогою ін'єкцій гіпофізу сазана та синтетичного гонадотропного рилізінг-фактору торгової марки “Ovopel” угорського виробництва.

Об'єм еякуляту визначали за допомогою піпет-дозатора “Erpendorf” з точністю до 0,1 см³. Якість сперми визначали за допомогою оптичного мікроскопа