

## ПОШУК СЕЛЕКТИВНИХ ДНК-МАРКЕРІВ КАНАЛЬНОГО СОМА

О.В. Хмельова<sup>1</sup>, Н.І. Безкровна<sup>1</sup>, В.Т. Сметанін<sup>1</sup>,  
М.А. Сидоров<sup>2</sup>, С.В. Гуцак<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Дніпропетровський державний аграрний університет, м. Дніпропетровськ

<sup>2</sup> Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

<sup>3</sup> ВАТ "Дніпрорибгосп", м. Дніпропетровськ

*Наведені результати пошуку в науковій літературі і власних досліджень видоспецифічних ДНК-маркерів каналного сома для їх застосування у селекційній роботі в сомоводстві.*

Застосування генетико-популяційних методів у рибництві дає змогу вирішувати актуальні рибогосподарські проблеми. Зокрема, робота з промисловими стадами риб спрямована на підвищення їх продуктивності, може бути реалізована через збільшення запасу мінливості популяції, необхідної для її розвитку і отримання генетичних ефектів при кросі ліній. Досягти збільшення генетичної дивергенції селекціонованих ліній риб можна методом різноспрямованого відбору особин з прижиттєвою оцінкою їх генотипів за конкретними молекулярними маркерами для формування різного аельного фонду в одних і тих самих локусах.

Традиційні селекційні програми вирощування риби є основою для використання методів кількісної генетичної мінливості для сільськогосподарського виробництва [1, 2]. Існує значний потенціал для використання генетично вдосконалених методик — таких, як селективне вирощування, маніпуляції з хромосомами, гібридизація, виробництво одностатевих груп і перенесення генів — для зростання продуктивності каналного сома [3]. Сучасні молекулярні методи допомагають встановити споріднені взаємозв'язки особин, а генетичні карти геномів — ідентифікувати генетичні маркери заданих ознак і визначити критерії відбору для селективної дії на риб [4].

Молекулярні карти генів домашніх тварин є основою для їх селективного розведення. Первинні карти зчеплення генів, що базуються на ДНК-маркерах, зокрема для риб — це тилапія і райдужна форель [5], спираліся переважно на маркери, ви-

явлені методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з довільними праймерами (RAPD), або методом поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів (AFLP). Такими маркерами є послідовності анонімної ДНК, які є доміантними і можуть бути видоспецифічними для картованої популяції тварин, у тому числі і риб. Як RAPD, так і AFLP-маркери характерні для каналного сома, демонструють низькі рівні внутрішньовидового поліморфізму [6, 7]. Альтернативою є карта зчеплення генів каналного сома, основана на мікросателітних локусах.

Мікросателітні локуси — це поліморфні послідовності ДНК, що містять короткі повторювальні послідовності. Вони розподілені за консервативними, що мало змінюються, регіонами ДНК геномів, і можуть демонструвати високі рівні внутрішньовидового аельного поліморфізму. Унікальні послідовності ДНК, розташовані на кордонах фланкуючих повторів, можуть бути використані для ідентифікації і подальшої характеристики регіонів геномів, що оточують ці локуси. Карти зчеплення генів, основані на мікросателітах, були розроблені для райдужної форелі і смугастого данію. Мікросателітні локуси також були включені в карту зчеплення генів тилапії [8].

Одним з методів, що дає змогу без визначення конкретної послідовності ДНК отримати індивідуальний для кожної особини електрофоретичний спектр, є ISSR-PCR (ПЛР з використанням мікросателітних локусів як ділянок відпалу праймерів і ампліфікації ділянок між їх інвертованими повторами — як правило,

це унікальна ДНК). Праймери складаються з короткого мотиву, компліментарного повтору мікросателіта і кількох (1–4) якірних нуклеотидів на 5'- або 3'-кінці, які визначають місце відпалу праймера. Мультилокусні спектри ампліфікації, що отримують в ISSR-PCR, налічують 10–60 смуг, які розділяють в агаровому або поліакриламідному гелі [9]. Перевага методу порівняно з RAPD-PCR полягає в тому, що такий підхід збільшує точність відпалу, відтворюваність ампліфікованих ділянок, оскільки про них відомо, що це відносно короткі фрагменти ДНК, розміщені між інвертованими повторами мікросателітного локусу [10]. Для проведення ампліфікації необхідна невелика кількість ДНК (5–50 ng на 1 реакцію). При цьому не вимагається попереднього знання нуклеотидної послідовності при дизайні праймерів. Ампліфікуються як структурні, так і некодуючі ділянки генома [10].

Проте отримуваний спектр ампліфіконів має певні обмеження, пов'язані з умовами ампліфікації. Так, зокрема, недоступними для аналізу є фрагменти дуже великої довжини (більше 2,5–3 kb).

Маркери ISSR-PCR на даний час набули значного поширення для таксономічного і філогенезу порівняння і як засіб картування широкого спектра організмів, чому сприяли такі властивості методу ISSR-PCR, як відносно висока точність і відтворюваність, високий рівень поліморфізму. За допомогою ISSR-PCR отримані геномні фінгерпринти ряду тварин — як ссавців, так і риб [10].

Канальний сом (*Ictalurus punctatus*, Raf. 1818), завезений із США в 1972 р., є цінним об'єктом товарного рибництва. Кліматичні умови України, головним чином південних її областей, дали змогу говорити про схожість водних режимів у цих районів і центральних штатів США, що виявилось передумовою на початку досліджень з акліматизації каналного сома у водоймах України. Він проявив себе в нових умовах як швидкорослий вид з хорошими смаковими якостями, здатністю ефективно використовувати штучні комбікорми для росту, легкістю отримання потомства, нескладною технологією вирощування. Рибопродуктивність вирощування його в садках і басейнах

тепловодних господарств сягала 90–150 кг/м<sup>2</sup> за витрати корму 2–2,8 од. [11, 12].

Нині внаслідок економічних обставин, що склалися у країні, значного подорожчання штучних комбікормів для риб, високої енергоємності індустріального рибництва в Україні значно скоротилася кількість тепловодних басейно-садкових господарств, що займаються розведенням каналного сома. Це призвело до зниження генетичної різноманітності промислових стад плідників каналного сома і, як наслідок, до зниження продуктивних якостей вирощуваної товарної риби.

Для виходу з ситуації, що склалася, необхідне використання більш сучасних і досконалих способів моніторингу генетичних процесів, що відбуваються у штучно відтворюваних популяціях і промислових стадах каналного сома. Йдеться, передусім, про молекулярну генетику і паспортизацію всіх плідників, які беруть участь у процесі штучного відтворення. Ці методи ефективні стосовно як і раніше перспективного напряму промислового вирощування каналного сома. Вони дають змогу ефективно використовувати його промислове дволінійне розведення, спрямоване на використання ефекту гетерозису в гібридів першого покоління від схрещування двох генетично різних ліній (Дубовик та ін., 1990).

Система дволінійного розведення пов'язана з проблемою надійного маркування ліній. У каналного сома зручною ознакою — маркером чистоти лінії може слугувати ознака альбінізму, який рано виявляється в онтогенезі. Це дає можливість проводити відбір альбінотичної лінії ще на личинковій стадії розвитку риб.

**Мета досліджень** — відтворити стадо каналного сома, вирощуваного в Придніпровському тепловодному рибному господарстві в басейнових умовах методом дволінійного розведення, спрямованого на використання ефекту гетерозису у гібридів першого покоління від схрещування двох генетично різних ліній. В подальшому буде сформоване промислове стадо, вільне від генетичного тягара внаслідок ймовірних випадків близькоспорідненого схрещування.

Це можливо за умови створення генетично різних батьківських ліній, що

мають альтернативний генотип за конкретними ДНК-маркерами, який асоціюється із забарвленням особин. З цієї метою нами було проведено типування стада каналних сомів Придніпровського тепловодного рибного господарства на предмет виявлення у них специфічних ділянок ДНК, яка могла стати селективно значимим маркером. Для цього були відібрані фрагменти хвостових плавців у особин різного забарвлення — темного, мармурового і альбіносів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження за визначенням і адаптацією умов проведення ISSR-PCR-типуювання при вивченні поліморфізму спектра ISSR-фрагментів генома різних морф забарвлення каналного сома (*Ictalurus punctatus*, Raf. 1818) проводили в лабораторії молекулярної генетики Полтавського Інституту свинарства (В.Н. Балацкий з колегами).

Для виділення ДНК з плавців каналного сома була використана методика виділення нуклеїнових кислот за допомогою реагенту “Chelex-100” як експрес-метод [14]. Цей метод, завдяки своїй простоті і доступності, допоміг значно скоротити термін проведення тестування риб.

У пластикову пробірку Eppendorf місткістю 1,5 мл до 50 г наважки плавця додавали 170–180 мкл 5%-го стерильного водного розчину Chelex-100 й інкубували впродовж 6 год за 56°C. Періодично ретельно перемішували на Vortex. Витримували 8 хв на водяній бані за 100°C. Знову ретельно перемішували струшуванням на Vortex, після чого центрифугували впродовж 5 хв за 8000 об/хв. Для ампліфікації використовували 3 мкл надосадової рідини. Зберігали зразки за –20°C, після кожного розморожування зразки перемішували і центрифугували впродовж 5 хв за 8 об/хв.

Як праймер для РСР-ампліфікації, за допомогою якого можна отримувати індивідуальні для кожної особини електрофоретичні спектри, нами був використаний тринуклеотидний праймер з первинною послідовністю: (AGC)6G.

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл складалася з таких компонентів: реакційний буфер — 2,5 мкл; 50 mM MgCl<sub>2</sub> — 0,5 мкл; 2,5 mM dNTPs — 2,5 мкл; праймер (S2) —

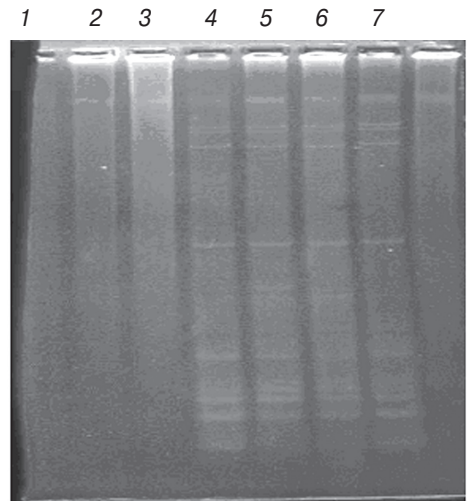
0,5 мкл; термостабільна полімераза — 0,3 мкл; ДНК — 3 мкл (виділена за допомогою реагенту Chelex-100); деіонізована вода до повного об'єму.

PCR проводили в ампліфікаторі в умовах такого температурного режиму: денатурація — 2 хв за 94°C; 30 циклів відпалу — 30 с за 94°C, 30 с за 56°C, 2 хв за 72°C; елонгація — 4 хв за 72°C.

Продукти ампліфікації розділяли в 2%-му агарозному гелі в 1 TBE за 20–22 mA з подаванням фарбуванням гелю бромистим етидієм, візуалізацією в УФ світлі на транслюмінаторі і фотодокументуванні (фото). Як маркер молекулярної маси використовували ДНК фагу λ/Pst 1 і λ/Eco 471.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використання праймера (AGC)6G, через його інформативність відносно мікросателітних локусів ДНК генома овець, свиней та інших сільськогосподарських тварин [10], при вивченні генетичних особливостей каналного сома на рівні первинної будови ДНК, не виявило індивідуальних відмінностей за частотами ISSR-PCR-маркерів у особин різних колірних морф забарвлення його тіла — альбінотичної, мармуровою, темною: спектри їх ампліконів були однаковими



Спектри досліджуваних ампліконів каналного сома за типами забарвлення тіла: 1, 5 — альбінос; 2, 7 — темний; 3, 6 — сірий, 4 — мармуровий

(див. фото). Отримані результати свідчать про те, що досліджений локус може бути міжвидовим маркером.

Незважаючи на те, що використання праймера (AGC) 6G не виявило селективного маркера для відбору плідників за забарвленням, перспективи використання цієї методики для паспортизації були очевидні, про що свідчать результати досліджень американських учених [8]. Ними були ідентифіковані мікросателітні локуси каналного сома в генетичних послідовностях або довільних клонах з невеликої частини бібліотеки ДНК генома. Аутбридні популяції каналного сома містили в середньому 8 алелів на локус і мали середній рівень гетерозиготності 0,70. Була складена карта зчеплення генів генома каналного сома (N=29) з двох еталонних родин. Усі 293 мікросателітних локуси виявилися поліморфними в одній або обох родинях із середньою кількістю інформативних мейозів на локус 171. Як вважають автори [8], мікросателітні локуси і карта зчеплення генів підвищать ефективність маркерних програм щодо селекції (MAS) і розведення каналного сома.

Низка дослідників виявила високі рівні алельного поліморфізму і фенотипної мінливості в селекційних і товарних популяціях каналного сома [15]. Це сприятиме вдосконаленню маркерно-селективних програм розведення риб. 70% поліморфних маркерів мікросателітів були на 0,6 або більш інформативними в поліморфному аспекті. Високий відсоток нових поліморфних маркерів, поміщених на карту зчеплення, забезпечить вищу ефективність селекційних програм. Ця ефективність уже доведена при ідентифікації особин риб і дослідженні ікри каналного сома на достовірність походження [16].

## ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать, що цей досліджений локус генома каналного сома може бути використаний як міжвидовий маркер. Подальші дослідження необхідно продовжити у напрямі пошуку ДНК-маркерів каналного сома і проведенні їх оцінки на придатність використання як селекційних маркерів певної спрямованості.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Bondari K. Response of channel catfish to multi-factor and divergent selection of economic traits // *Aquaculture*. — 1986. — Vol. 57. — P. 163–170.
2. Wolters W.R., Johnson M.R. Analysis of a diallel cross to estimate effects of crossing on resistance to enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* // *Aquaculture*. — 1995. — Vol. 137. — P. 263–269.
3. Gjedrem T. Selective breeding to improve aquaculture production // *World Aquaculture*. — 1997. — Vol. 28. — P. 33–45.
4. Danzmann R.G., Jackson T.R., Ferguson M.M. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout // *Aquaculture*. — 1999. — Vol. 173. — P. 45–58.
5. Kocher T.D., Lee W.-J., Sobolewska H., Penman D. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *Genetics*. — 1998. — Vol. 148. — P. 1225–1232.
6. Liu Z., Li P., Argue B.J., Dunham R.A. Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross hybrids // *Anim. Genet.* — 1998a. — Vol. 29. — P. 58–62.
7. Liu Z., Nichols A., Li P., Dunham R.A. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and back cross hybrids // *Mol. Gen. Genet.* — 1998b. — Vol. 258. — P. 260–268.
8. Geoffrey C. Waldbieser et al. A Microsatellite-Based Genetic Linkage Map for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* // *Aquaculture*. — 1999. — Vol. 32. — P. 43–49.
9. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. — 1994. — Vol. 20. — P. 176–183.
10. Глазко В.И., Шульга Е.В., Дымань Т.Н., Глазко Г.В. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. — Белая Церковь, 2001. — С. 66–67.
11. Методические рекомендации по биотехнике разведения и выращивания сеголеток каналного сома во внутренних водоемах УССР / П.Т. Галасун, В.В. Грусевич. — Львов: УкрНИИРХ, 1978. — 25 с.

12. Гривевич В.В., Сидоров М.А., Доценко Н.В. Технологія відтворення канального сома у внутрішніх водоймах України: Зб. інструктивно-технологічної документації "Інтенсивне рибництво". — К.: Аграрна наука, 1995. — С. 98–122.
13. Дубовик Н.Ф., Илясов Ю.И., Михайлова С.Ш., Петин В.Н. Использование альбиносов канального сома для двухлинейного разведения: Рекомендации. — М.: ВНИИПРХ, 1990. — 8 с.
14. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // *BioTechniques*. — 1991. — № 10. — P. 506.
15. Waldbieser G.C., Bosworth B.G. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus* // *Anim. Genet.* — 1997. — Vol. 28. — P. 295–298.
16. Waldbieser G.C., Wolters W.R. Application of polylinkage morphic microsatellite loci in a channel catfish, *Ictalurus punctatus*, breeding program // *J. World Aqua.* — 1999. — Soc. 30. — P. 256–262.

### ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ КАНАЛЬНОГО СОМА

*Е.В. Хмелева, Н.И. Безкровная, В.Т. Сметанин, Н.А. Сидоров, С.В. Гуцак*

В статье изложены результаты поиска в научной литературе и собственных исследований видоспецифических ДНК-маркеров канального сома для их применения в селекционной работе в сомоводстве.

### SEARCH OF SELECTIVE DNA-MARKERS OF CATFISH

*E. Hmeleva, N. Besкровnaja, V. Smetanin, N. Sidorov, S. Guchsak*

In the article the results of search of specific DNA-markers of catfish are expounded for their application in selection work.