

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 морфофізіологічними 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  $-18^{\circ}\text{C}$ . 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.

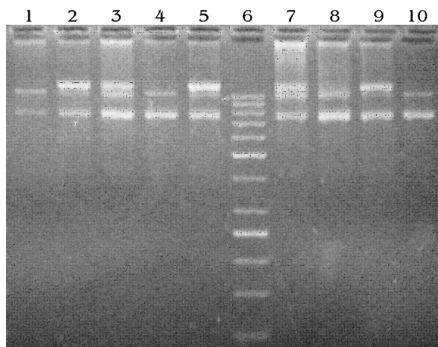


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами (СТС)<sub>6</sub>C у сазана амурського: доріжки № 1–5, № 7–10 — особи групи; № 6 — маркер молекулярної маси

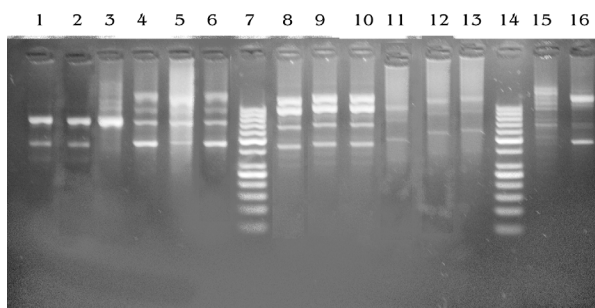


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами у сазана амурського: доріжки № 1–3 — праймер (СТС)<sub>6</sub>C; № 4–6 — праймер (AGC)<sub>6</sub>C; № 8–10 — праймер (AGC)<sub>6</sub>G; № 11–13 — праймер (GAG)<sub>6</sub>C; № 15–16 — праймер (ACG)<sub>6</sub>G;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

Одержані спектри оцінювали на гетерогенність зразків. Праймери (СТС)<sub>6</sub>C і (ACG)<sub>6</sub>G давали однаковий діапазон молекулярних мас ампліконів (1500–350). Дещо меншу межу розподілу демонстрували праймери (AGC)<sub>6</sub>C і (AGC)<sub>6</sub>G (1200–450 та 1100–300 нуклеотидів відповідно). Найменша межа розподілу спостерігалась при використанні праймеру (GAG)<sub>6</sub>C — 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)<sub>6</sub>C відмічалось 4 мажорних та 5 міnorних ампліконів, для праймера (AGC)<sub>6</sub>C — 4 мажорні, для праймера (AGC)<sub>6</sub>G — 4 мажорні та 6 міnorних, для праймера (GAG)<sub>6</sub>C — 3 мажорні та 2 міnorні смуги, а для праймера (ACG)<sub>6</sub>G — 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.