

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 575.22; 639.371.5

ІНФОРМАТИВНІСТЬ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ БІЛОГО ТА СТРОКАТОГО ТОВСТОЛОБИКІВ

Н.О. Борисенко, b_natalia@i.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
І.І. Грициняк, info@ifr.com.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
С.І. Тарасюк, tarasjuk@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Мета. Метою даної роботи був підбір мікросателітних маркерів для дослідження генетичної структури популяцій білого та строкатого товстолобиків господарства ВАТ «Донрибкомбінат», Слов'янський район, Донецька область.

Методика. Продукти ампліфікації розділяли в 2%-ому агарозному гелі в 1x TBE-буфері. Візуалізацію проводили за допомогою транслюмінатора в УФ-ділянці спектра з фіксуванням електрофореграм цифровою камерою. Опрацювання та аналіз гелів проводили за допомогою програми TotalLab v2.01. Частота кожного амплікону за певним локусом становила частку (%) від загальної кількості ампліконів за цим локусом. Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали за програмою Excel.

Результати. В результаті проведеної роботи при дослідженні популяцій білого та строкатого товстолобиків було проаналізовано генотипи особин за використання трьох мікросателітних локусів ДНК: MFW 15, MFW 23, MFW 06.

Наукова новизна. Вперше показано, що для дослідження генетичної структури стад білого і строкатого товстолобиків ВАТ «Донрибкомбінат» найбільш інформативними виявилися мікросателітні локуси MFW 15 і MFW 23.

Практична значимість. Використані в роботі мікросателітні локуси MFW 15 і MFW 23 придатні для міжвидової диференціації популяцій товстолобиків і можуть застосовуватись в популяційно-генетичних дослідженнях цих риб.

Ключові слова: білий товстолобик, строкатий товстолобик, мікросателітні локуси.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ

Інтродукція білого (*Hypophthalmichthys molitrix*) та строкатого (*Aristichthys nobilis*) товстолобиків в Україну розпочалась з 1953 р. [1]. Нині вони поширені практично у всіх рибогосподарських водоймах країни та є одним з важливих об'єктів товарного рибництва. Стада товстолобиків в рибних господарствах України представлені як гібридними, так і чистопорідними популяціями, які характеризуються високим рівнем інбридингу. Варто зазначити, що селекціонери інших країн відзначають подібну ситуацію [2, 3]. Як результат — істотно знижуються репродуктивні можливості та резистентність організму риб до ураження збудниками хвороб, що зрештою призводить до зниження життєстійкості та непрогнозованих втрат риби на всіх етапах вирощування та в період зимівлі [4]. Тому для підвищення ефективності селекційної роботи виникає необхідність пошуку інформативних молекулярно-генетичних маркерів, котрі дали б можливість проведення генетичної інвентаризації популяцій та оцінки рівня гібридизації різних груп товстолобика. В останні роки в генетиці знайшли



застосування нові молекулярні маркери — фрагменти ДНК, відповідних нуклеотидних послідовностей, які входять безпосередньо до структури гену, або зчеплені з цим геном. Кількість ДНК-маркерів значно перевищує кількість маркерів білків та ізоферментів. Слід наголосити, що аналіз поліморфних систем займає важливе місце в селекції коропових риб. Аналіз генетичної структури груп товстолобика шляхом використання методів молекулярної генетики дозволяє встановити їх походження, ступінь генетичної подібності, а також зміни геному у відповідь на дію чинників штучного та природного відборів. Популяційно-генетичні зміни є інтегральним показником дії різних чинників на геном риб, тому особливе значення має аналіз генетичної структури у селекції товстолобика, вирощеного у внутрішніх водоймах, екологічний стан яких часто змінюється. Обґрунтовані методи оцінки генетичної структури популяції товстолобика та її корекції в конкретних умовах вирощування дозволяють оптимізувати селекційний процес та адаптацію до змін умов середовища. Ефективним методом у даному аспекті може стати використання мікросателітних маркерів. Порівняльний аналіз генетичної структури з використанням різних типів маркерів є важливим для виявлення систем, найбільш залучених до процесів диференціації та вирішення окремих питань генетики [5]. На сьогодні для дослідження генетичної структури товстолобика описана значна кількість поліморфних мікросателітних локусів ДНК [6, 7]. Очевидно, що використання відомих та підбір нових мікросателітних маркерів має загальнобіологічне значення і є важливою проблемою сучасного рибиництва.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Метою даної роботи була оцінка інформативності мікросателітних маркерів при проведенні генетичної диференціації популяцій білого та строкатого товстолобиків господарства ВАТ «Донрибкомбінат», Слов'янський район, Донецька обл.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

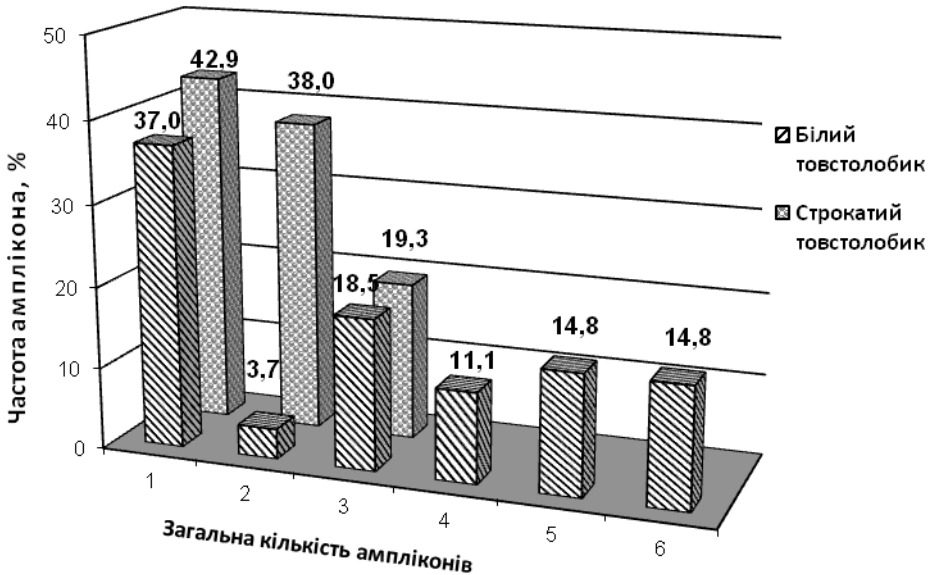
Очищення геномої ДНК проводили за допомогою наборів «GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Kit» за запропонованою виробником методикою. Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили в термоциклері «Eppendorf», застосовуючи наступний температурний режим: 94 °C — 2 хв, 33× (94 °C — 30 с, 56 °C — 30 с, 72 °C — 2 хв), 72 °C — 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли в 2 %-ому агарозному гелі в 1х TBE-буфері. Візуалізацію проводили за допомогою трансілюмінатора в УФ-ділянці спектра з фіксуванням електрофореграм цифровою камерою. Опрацювання та аналіз гелів проводили за допомогою програми TotalLab v 2.01. Частота кожного амплікону за певним локусом становила частку (%) від загальної кількості ампліконів за цим локусом [8]. Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали за програмою Excel, «Biosys-1».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В процесі дослідження популяцій білого та строкатого товстолобиків було проаналізовано генотипи 24 особин за використання трьох мікросателітних локусів ДНК: MFW 15, MFW 23, MFW 06 [9]. За локусом MFW 15 у строкатого товстолобика було виявлено 3 амплікони: 63 пари основ (п.о.), що траплялися з



частотою 42,86 %, 158 п.о. — 38,00 %, та 293 п.о. — 14,29 %. При використанні праймеру MFW 23 було виявлено 5 алелей — 82 п.о., частота становила 39,3 %, 123 п.о. — 17,39 %, 138 п.о. — 21,74 %, 248 п.о. — 4,35 % та 265 п.о. — 17,39 %



(рис.1, 2).

Рис.1. Загальна кількість та частота ампліконів у групах білого та строкатого товстолобиків за використання мікросателітного маркера MFW15

Дослідження, проведені за використання праймеру MFW 23, показали, що він є малоінформативним. За цим праймером визначено 2 амплікони, довжиною 85 п.о. та 153 п.о., що були присутніми у 100 % особин білого товстолобика (рис. 1, 2).

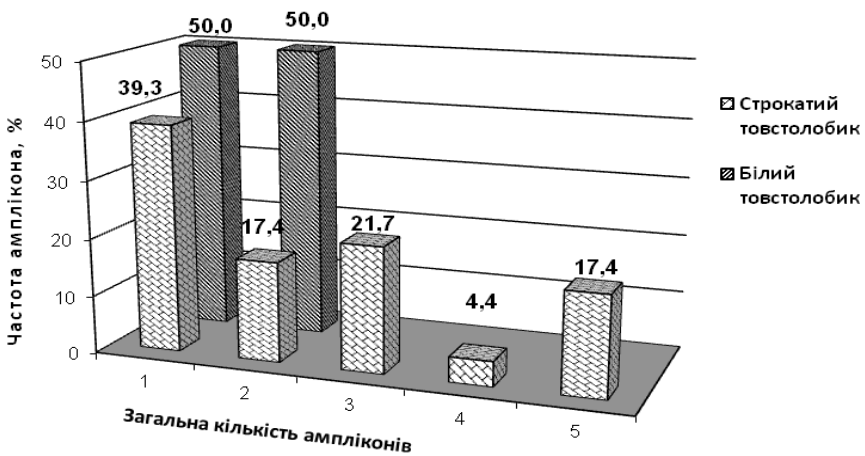


Рис. 2. Загальна кількість та частота ампліконів у групах білого та строкатого товстолобиків за використання мікросателітного маркера MFW23



У білого товстолобика за локусом MFW 15 було визначено 6 ампліконів: 78 п.о. — траплялися з частотою 37 % (виявлений у 100 % особин), 153 п.о. — 3,70 %, — 14,81 %, 197 п.о. — 18,52 %, 552 п.о. — 11,11 % та амплікони довжиною 171 п.о. і 570 п.о. з частотою 14,81 % (виявлені у 40 % особин). В результаті досліджень за використання мікросателітного локусу MFW 6 було встановлено, що цей праймер малоінформативний для дослідження генетичної структури товстолобиків. Виявлено по 2 амплікони, що траплялися у 100 % особин обох видів. Таким чином, серед перевірених праймерів для дослідження генетичної структури білого та строкатого товстолобиків можна використовувати мікросателітні локуси MFW 15 та MFW 23. Слід зазначити, що число алелів в деякій мірі характеризує внутрішньовидову генетичну різноманітність та ймовірність її збереження в наступних поколіннях. В теперішній час у вчених немає єдиної думки про вплив селекційного тиску на ступінь поліморфізму і гетерозиготності популяцій. В окремих випадках внаслідок тривалого спрямованого відбору відзначають консолідацію за певними генетичними параметрами, що призведе до зниження генетичного різноманіття і втрати окремих алелів в породах, з іншого боку, в високопродуктивних стадах спостерігається наростання числа гетерозигот і поліморфізму в порівнянні з вихідними лініями. Аналіз даних показав, що найбільш поліморфним виявився локус MFW 15 у білого товстолобика, у якого ідентифіковано 6 алелів на локус, і локус MFW 23 у строкатого товстолобика, у якого ідентифіковано 5 алелів на локус. Таку кількість не відзначали за жодним з досліджених локусів ні в білого, ні в строкатого товстолобика. Два алелі було виявлено у білого товстолобика за використання локусу MFW 23. Порівняно консервативним був локус MFW 6, у вивчених мікросателітах обох видів рееструвалося всього 2 алелі (табл. 1).

Таблиця 1. Число алелів у локусах мікросателітів у товстолобиків різних видів

Вид	Число алелів в локусах мікросателітів		
	MFW 6	MFW 15	MFW 23
Білий товстолобик	2	6	2
Строкатий товстолобик	2	3	5

На сьогоднішній день методи генетичного аналізу та геносистематики успішно використовуються в риборицтві і дозволяють проводити не тільки ідентифікацію видів, але і встановити еволюційні та філогенетичні зв'язки. Мікросателіти є одними з найбільш поширених маркерів в дослідженні генетичної структури сільськогосподарських тварин, зокрема, вони відіграють суттєву роль для встановлення генетичної структури популяцій риб [10, 11, 12]. Ефективність використання методу мікросателітних маркерів полягає у високій швидкості їх мутаційної мінливості та кодомінантному характері успадкування, що дозволяє оцінити внутрішньовидовий та міжвидовий поліморфізм. Сучасні літературні дані свідчать, що найбільш гострою проблемою даного методу є підбір інформативних праймерів [13]. Саме від успішності даного етапу залежить загальна ефективність генетичної ідентифікації. Результати проведених досліджень з використанням методик на основі поліморфізму ДНК-маркерів показали, що для індивідуального генотипування необхідно підбирати високоспецифічні маркери, поліморфізм за якими можна виявляти на рівні особин. Використані нами праймери не дали можливості провести індивідуальне



типування за специфічністю спектрів. Даний метод — ефективний інструмент, придатний для видової ідентифікації. Використані праймери дозволили провести міжвидову диференціацію. Методика дає можливість використання оптимальних SSR молекулярно-генетичних маркерів для подальших популяційно-генетичних досліджень білого та строкатого товстолобиків.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Для дослідження генетичної структури білого та строкатого товстолобиків доцільно використовувати мікросателітний маркер MFW 15. Маркер MFW 23, є інформативним лише для строкатого товстолобика. Маркер MFW 6 виявився недостатньо інформативним, хоча і надає певну частку інформації про генетичну структуру популяції. Даний метод аналізу мікросателітних локусів ДНК цілком придатний для популяційного генотипування та аналізу філогенетичних зв'язків білого та строкатого товстолобиків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Організація селекційно-плеємної роботи в рибництві / [Гринжевський М.В., Шерман І.М., Грициняк І.І. та ін.]. — К. : Рибка моя, 2006. — 340 с.
2. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock of Bangladesh, using DNA microsatellite loci / M.Y. Mia, J.B. Taggart, A.E. Gilmour [et al.] // *Aquaculture*. — 2005. — V. 247. — P. 267 – 273.
3. Microsatellite Markers for Parentage Identification of Crossbreeding Carp (*Cyprinus carpio*) in a Selective Breeding Programme / WU Yao, JIA ZhiYing, LI [et al.] // *Journal of Agricultural Biotechnology*. — 2012. — V. 20 (5). — P. 549 – 559.
4. Фермерське рибництво / [Грициняк І.І., Гринжевський М.В., Третяк О.М., та ін.]. — К. : Герб, 2008. — 560 с.
5. Панель мікросателітних локусів для популяційних досліджень сахалінського тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort) / Шитова М.В., Юрченко А.А., Шайхаєв Е.Г. [и др.] // *Генетика*. — 2012. — Т. 48, № 8. — С. 976 – 982.
6. Gheyas A.A. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species/ Gheyas A.A., Cairney M., Gilmour A.E. [et al.] // *Molecular Ecology Notes* (Accepted). — 2006. — P. 287 – 293.
7. Development of a microsatellite multiplex genotyping tool for the fish Gilthead seabream (*Sparus aurata*): applicability in population genetics and pedigree analysis / Javier Porta, Jose Maria Porta, Julia Belar [et al.] // *Aquaculture Research*. — 2010. — V. 41. — P. 1514 – 1522.
8. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / Crooijmans RPMA, Bierbooms V.A.F., Komen J. [et al.] // *Animal Genetics*. — 1997. — V. 28. — P. 129 – 134.
9. Слуквин А.М. Генетическая идентификация стерляди, выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области, по микросателітним маркерам / А.М. Слуквин, О.Ю. Конева, М.И. Лесюк // *Молекулярная и прикладная генетика*. — 2009. — Т. 9. — С. 146 – 152.
10. Ровба Е. А. Оценка генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции с помощью микросателітних маркерів / Е.А. Ровба, О.Ю. Конева, С.Е. Дромашко // *Актуальные проблемы выращивания и переработки прудовой рыбы : междунар. науч.-техн. интернет-конференция : тезисы*. — Краснодар : ФГБОУ Кубанский государственный технологический университет, 2012. — С. 22 – 23.
11. Шитова М.В. Микросателітная изменчивость заводских популяций кеты



- (*Oncorhynchus keta* Walbaum) о. Сахалин / М.В. Шитова, К.И. Афанасьев, Г.А. Рубцева // Вопросы рыбоводства. — 2009. — Т. 10, № 1. — С. 102 – 115.
12. Луданный Р.И. Полиморфизм микросателитных маркеров у пород домашнего карпа (*Cyprinus carpio* L.) отечественной селекции / Р.И. Луданный, Г.Г. Хрисанфова, В.К. Призенко, [и др.] // Генетика. — 2010. — Т. 46, № 5. — С. 652 – 658.
13. Bartfai R. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers / R. Bartfai, S. Egedi, G.H. Yue // *Aquaculture*. — 2003. — V. 219. — P. 157 – 167.

REFERENCES

1. Hrynzhovskyi, M.V., Sherman, I.M., Hrytsyniak, I.I. та in. (2006). Orhanizatsiia selektsiino-pleminnoi roboty v rybnystvi. Kyiv., *Rybka moia*.
2. Mia, M.Y., Taggart, J.B., Gilmour, A.E. [et al.] (2005). Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock of Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, 267-273.
3. Yao, WU, ZhiYing, JIA, LI [et al.] (2012). Microsatellite Markers for Parentage Identification of Crossbreeding Carp (*Cyprinus carpio*) in a Selective Breeding Programme. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 549-559.
4. Hrytsyniak, I.I., Hrynzhovskyi, M.V., Tretiak, O.M., та in. (2008). *Fermerske rybnystvo*. Kyiv., Herb.
5. Shitova, M.V., Yurchenko, A.A., Shaykhaev E.G., i dr. (2012). Panel' mikrosatelitnykh lokusov dlya populyatsionnykh issledovaniy sakhalinskogo taymenya Parahucho perryi (Brevoort). *Genetika*, 976-982.
6. Gheyas, A.A., Cairney, M., Gilmour, A.E. [et al.] (2006). Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species. *Molecular Ecology Notes* (Accepted), 287-293.
7. Javier Porta, Jose Maria Porta, Julia Belar [et al.] (2010). Development of a microsatellite multiplex genotyping tool for the fish Gilthead seabream (*Sparus aurata*): applicability in population genetics and pedigree analysis. *Aquaculture Research*, 1514-1522.
8. Crooijmans, RPMA, Bierbooms, VAF, Komen, J. [et al.] (1997). Mikrosatelit markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*, 129-134.
9. Slukvin, A.M., Koneva O.Yu., Lesyuk, M.I. (2009). Geneticheskaya identifikatsiya sterlyadi, vyrashchennoy v OAO «Rybkhoz «Poles'e» Pinskogo rayona Brestskoy oblasti, po mikrosatelitnym markeram. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*, 146-152.
10. Rovba, E.A., Koneva, O.Yu., Dromashko, S.E. (2012). Otsenka geneticheskogo raznobraziya porod karpa belorusskoy selektsii s pomoshch'yu mikrosatelitnykh markerov. Krasnodar, *FGBOU «Kubanskiy gosudarstvennyy tekhnologicheskyy universitet»*, 22-23.
11. Shitova, M.V., Afnas'ev, K.I., Rubtsova, G.A. (2009). Mikrosatelitnaya izmenchivost' zavodskikh populyatsiy kety (*Oncorhynchus keta* Walbaum) о. Sakhalin. *Voprosy rybovodstva*, 102-115.
12. Ludanny, R.I., Khrisanfova, G.G., Prizenko, V.K., [i dr.] (2010). Polimorfizm mikrosatelitnykh markerov u porod domashnego karpa (*Cyprinus Carpio* L.) otechestvennoy selektsii. *Genetika*, 652-658.
13. Bartfai, R., Egedi, S., Yue, G.H. (2003). Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, 157-167.



ІНФОРМАТИВНОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
БЕЛОГО И ПЕСТРОГО ТОЛСТОЛОБИКОВ

Н.А. Борисенко, b_natalia@i.ua, Інститут рибного господарства НААН, г. Київ
І. І. Грициняк, info@ifr.com.ua, Інститут рибного господарства НААН, г. Київ
С. І. Тарасюк, tarasjuk@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, г. Київ

Цель. Целью данной работы был подбор микросателлитных маркеров для исследования генетической структуры популяций белого и пестрого толстолобиков хозяйства ОАО «Донрыбкомбинат», Славянский район, Донецкая область.

Методика. Продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле в 1x TBE-буфере. Визуализацию проводили с помощью трансиллюминатора в УФ-участке спектра с фиксированием электрофореграмм цифровой камерой. Обработку и анализ гелей проводили с помощью программы TotalLab v2.01. Частота каждого ампликона по определенному локусу составляла долю (%) от общего количества ампликонов по данному локусу. Статистическую обработку полученных результатов проводили по программе Excel.

Результаты. В результате проведенной работы при исследовании популяций белого и пестрого толстолобиков было проанализировано генотипы особей при использовании следующих микросателлитных локусов ДНК: MFW 15, MFW 23, MFW 06.

Научная новизна. Впервые показано, что для исследования генетической структуры стад белого и пестрого толстолобиков ОАО «Донрыбкомбинат» наиболее информативными оказались микросателлитные локусы MFW 15 и MFW 23.

Практическая значимость. Используемые в работе микросателлитные локусы MFW 15 и MFW 23 пригодны для межвидовой дифференциации популяций толстолобиков и могут применяться в популяционно-генетических исследованиях этих рыб.

Ключевые слова: белый толстолобик, пестрый толстолобик, микросателлитные локусы.

INFORMATIONAL CONTENT OF MICROSATELLITE LOCI FOR ANALYSIS OF
GENETIC STRUCTURE OF SILVER AND BIGHEAD CARPS

N. Borysenko, b_natalia@i.ua, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv
I. Hrytsyniak, info@ifr.com.ua, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv
S. Tarasjuk, tarasjuk@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Purpose. The goal of this work was the selection of microsatellite markers to study the genetic structure of populations of silver and bighead carps of fish farm JSC "Donrybkombinat" of Donetsk region.

Methodology. Products of amplification were separated in 2 % agarose gel in 1xTBE buffer. Visualization was performed with help of transilluminator in UV-region of the spectrum and photographing of electrophoregrams by digital camera. Processing and analysis of gels were performed using program TotalLab v2.01. The frequency of each amplicon by particular locus was determined as a percentage from the total number of amplicons at this locus. Statistical analysis of results was carried out using programs Excel, «Biosys-1».

Findings. At the results of investigations of populations silver carp and bighead carp were analyzed genotypes of individuals by using three microsatellite DNA loci: MFW 15, MFW 23, MFW 06.

Originality. It has been first shown that to investigate genetic structure of Ukrainian silver and bighead carps of JSC "Donrybkombinat" the most informative microsatellite loci were MFW 15 and MFW 23.

Practical value. Microsatellite loci MFW 15 and MFW 23 used in research were suitable for interspecies differentiation of Ukrainian silver and bighead carps and can be applied in population-genetic investigations of fishes.

Key words: silver carp, bighead carp, microsatellite loci.

