

УДК 639.3:575
© 2013

Т.А. Нагорнюк,
кандидат сільсько-
господарських наук

О.В. Залоїло,
кандидат
біологічних наук

С.І. Тарасюк,
член-кореспондент НААН
Інститут
рибного господарства НААН

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ КОРОПА АНТОНІНСЬКО- ЗОЗУЛЕНЕЦЬКОГО ТИПУ

Вивчено генетичну структуру українських порід коропа. Виявлено міжпородну диференціацію за частотою алелів локусів MDH і KAT. Установлено, що фактичний рівень середньої гетерозиготності у порід коропа вищий від теоретично розрахованого. За використання ISSR-PCR-методу виявлено окремі маркери ДНК – (AGC)₆C і (AGC)₆G, які можуть залучатися для генотипування особин українських лускатої і рамчастої порід коропа антонінсько-зозуленецького типу.

Ключові слова: міжпородна диференціація, гетерозиготність, маркери, генотипування, породи коропа.

В Україні одним з основних об'єктів ставового рибництва є короп, селекційно-племінній роботі з яким приділяють значну увагу. Одним із методів підвищення та поліпшення племінних і продуктивних якостей є створення гетерогенної структури українських порід коропа. Генетична структура за різними типами молекулярно-генетичних маркерів має складну структуру і вивчена в українських порід фрагментарно [6]. Практично невідомо, який рівень генетичної мінливості характерний для популяцій українських коропів, не повністю відомий таксономічний статус і філогенетичні взаємозв'язки між ними. Для впровадження генетичного моніторингу в систему селекційно-племінної роботи потрібно також проводити популяційно-генетичні дослідження та розробки стратегій і заходів щодо збереження біологічного різноманіття коропових риб, які неможливі без відомостей про їх генетичну структуру. Аналіз генетичної структури популяцій риб дає змогу вивчити генетичний поліморфізм і рівень гетерогенності за окремими маркерами, проводити біохімічне, молекулярно-генетичне дослідження племінного матеріалу з метою виявлення та збереження кращих генетичних ресурсів для подальшого їхнього використання.

Останні досягнення в геномному аналізі нерозривно пов'язані з використанням і розвитком методів молекулярної біології. Велике значення мають молекулярно-генетичні маркери, дослідження яких сприяє поглибленому вивченню закономірностей динаміки генетичної структури порід, типів і ліній риб у процесі їхньої мікроеволюції [2, 10].

Використання маркерних генів для контролю генетичної структури риб вже увійшло в практику рибництва багатьох країн [12, 18]. Різні типи ДНК-маркерів застосовують в аквакультурі для дослідження коропових риб [4, 8, 16]. Оцінка поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів, може об'єктивніше відображати внутрішньопопуляційне генетичне різноманіття. ISSR-маркери можуть бути використані для картування геномів і маркування господарсько корисних ознак [11].

Оскільки створення племінного стада антонінсько-зозуленецьких коропів було початковим моментом у створенні українських лускатої і рамчастої порід коропа, тому важливим є дослідження генофонду та закріплення генетичного потенціалу цього типу коропа з метою їхньої подальшої державної апробації. Саме тому дослідження в цьому напрямі є актуальними і потребують аналізу за використання молекулярно-генетичних маркерів.

Мета роботи — комплексні дослідження з вивчення генетичної структури рамчастих і лускатих коропів антонінсько-зозуленецького типу за використання різних молекулярно-генетичних маркерів: генетико-біохімічних систем та анонімних послідовностей мікросателітних маркерів.

Матеріали і методи. У дослідження включено зразки крові українських лускатої (УЛК) і рамчастої (УРК) порід коропа антонінсько-зозуленецького типу ДП СГЦР «Поділля». Зразки крові відбирали з хвостової вени. Консервантом був гепарин (25 МО на 1 мл крові). Кров

1. Розподіл генотипів за досліджуваними локусами у коропів українських порід

Локус	Генотип	УЛК				УРК			
		G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P	G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P
TF	AA	0	0,188			1	0,302		
	AC ₁	5	4,510			7	6,779		
	AC ₂	3	1,933			0	1,208		
	AD	0	0,591			1	0,336		
	BB	1	0,369			1	0,805		
	BC ₁	6	6,201			9	10,846		
	BC ₂	2	2,658			4	1,933		
	BD	1	0,812			1	0,537		
	C ₁ C ₁	24	23,396			38	33,893		
	C ₁ C ₂	18	20,295			7	12,201		
	C ₁ D	7	6,201			2	3,389		
	C ₂ C ₂	5	4,228	4,2	>0,05	3	1,027	15,6	>0,05
	C ₂ D	3	2,658			1	0,604		
ALB	AA	4	14,451			7	12,129		
	AB	59	38,098	23,5	<0,001	36	25,743	8,3	<0,01
	BB	14	24,451			8	13,129		
EST	FF	21	22,536	0,5	>0,05	12	19,128	10,8	<0,001
	FS	41	37,927			52	37,745		
	SS	14	15,536			11	18,128		
MDH	FF	19	28,007			23	29,336		
	FS	52	33,986	20,6	<0,001	48	35,329	9,8	<0,01
	SS	1	10,007			4	10,336		
ME	FF	13	20,404			14	19,128		
	FS	53	38,192	11,6	<0,001	48	37,745	5,6	<0,05
	SS	10	17,404			13	18,128		
CA	FF	18	26,523			18	26,282		
	FS	54	36,954	16,4	<0,001	53	36,436	15,7	<0,001
	SS	4	12,523			4	12,282		
SOD	FF	4	10,630			3	9,130		
	FS	34	20,741	17,2	<0,001	32	19,740	15,4	<0,001
	SS	3	9,630			4	10,130		
KAT	FF	7	12,222			10	14,039		
	FS	31	20,556	10,9	<0,001	27	18,922	7,3	<0,01
	SS	3	8,222			2	6,039		

Примітка. G_{exp} — очікувані генотипи; G_{obs} — фактичні генотипи.

фракціонували центрифугуванням упродовж 10 хв за 3,5 тис. об./хв. Отримані фракції плазми крові, лейкоцитів та еритроцитів фасували у пробірки і зберігали за -18°C .

Електрофоретичне розділення білків і ферментів крові проводили за допомогою вертикального поліакриламідного та горизонтального крохмального електрофорезів [5, 13, 15] з

2. Рівень гетерозиготності за генетико-біохімічними системами у коропів

Локус H	TF	EST	MDH	ME	ALB	CA	SOD	KAT	H _{середня}
УЛК									
H _{obs}	0,600	0,539	0,722	0,697	0,766	0,711	0,829	0,756	0,703±0,033
H _{exp}	0,619	0,499	0,472	0,503	0,495	0,486	0,506	0,501	0,510±0,016
УПК									
H _{obs}	0,427	0,693	0,640	0,640	0,706	0,707	0,821	0,692	0,666±0,039
H _{exp}	0,519	0,503	0,471	0,503	0,505	0,486	0,506	0,485	0,497±0,005

Примітка. H_{exp} — очікуваний рівень гетерозиготності; H_{obs} — фактичний рівень гетерозиготності.

власними модифікаціями [6] та гістохімічним фарбуванням і генотипуванням [3].

Проаналізовано генетичну структуру коропів за генетико-біохімічними маркерами: трансферину (TF), альбуміну (ALB), естерази (EST, К.Ф.3.1.1.1), малатдегідрогенази (MDH, К.Ф.1.1.1.37), малік-ензиму (ME, К.Ф.1.1.1.40), карбоангідрази (CA, К.Ф.4.2.1.1), супероксид-дисмутази (SOD, К.Ф.1.15.1.1) та каталази (KAT, К.Ф.1.11.1.6) [14].

Очищення геномої ДНК проведено за допомогою наборів «GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Kit» за запропонованою виробником методикою, цілісність ДНК перевірено електрофоретичним методом у 0,8%-му гелі (TopVision™ Agarose). Для дослідження специфіки генетичної структури коропів використано ISSR-PCR методику з праймерами такої послідовності: (CTC)₆C, (AGC)₆C, (AGC)₆G, (GAG)₆C. Ампліфікацію фрагментів ДНК проведено в термоциклері «Eppendorf» за такого температурного режиму: 95°C — 2 хв, 35 (94°C — 30 с, 56°C — 30 с, 72°C — 2 хв), 75°C — 10 хв. Після проведення 35 циклів ПЛР 10 мкл суміші аналізували електрофоретично в 2%-му агарозному гелі. Візуалізацію проведено на транслюмінаторі в УФ-світлі з фіксуванням електрофореграм цифровою камерою, обробку та аналіз гелів — за допомогою програми TotalLab v2.01. Частоту кожного амплікону за певним праймером визначено як відсоток від загальної кількості ампліконів за даним праймером [9].

Статистичну обробку отриманих результатів здійснено в програмах Excel, «Biosys-1» [7, 19].

Результати досліджень. Проаналізовано генетичну структуру українських порід коропа антонінсько-зозуленецького типу за генетико-біохімічними маркерами.

За локусом TF виявлено 5 алельних варіантів (A, B, C₁, C₂, D), з найвищою частотою

траплялися алелі Tf C₁ (у лускатих — 0,560, у рамчастих коропів — 0,673) і Tf C₂ (у лускатих — 0,240, у рамчастих — 0,120). Частота інших алелів була істотно нижчою: Tf A (у лускатих — 0,053, рамчастих — 0,067), Tf D (0,073 і 0,033), Tf B (у лускатих коропів — 0,073).

Алельні варіанти з високою і низькою молекулярною масою у лускатої і рамчатої порід коропа траплялися з частотою за локусами: ALB — від 0,435 до 0,565, EST — від 0,454 до 0,546. Алельний варіант локусу MDH з низькою молекулярною масою Mdh F (у лускатих — 0,625, рамчастих — 0,627) траплявся у коропів значно частіше, ніж алель Mdh S (у лускатих — 0,375, у рамчастих — 0,373).

За локусами CA, SOD у коропів виявлено 2 алельні варіанти з різною електрофоретичною рухливістю, частота яких у порід коропа істотно не відрізнялася. Породні відмінності виявлено за локусом KAT: у рамчастих коропів алель з низькою молекулярною масою Kat F (0,603) значно переважав алель Kat S (0,397), а у лускатих — частота Kat F і Kat S помітно не відрізнялася.

Співвідношення виявлених генотипів було наближеним до очікуваного за локусом TF в обох порід та локусу EST у лускатих коропів. Виявлено найбільшу кількість генотипів Tf C₁C₁, що є притаманним для українських порід коропа (табл. 1).

Рівень гетерозиготності за локусами генетико-біохімічних систем є однією з найважливіших генетичних характеристик популяції, за якою визначають рівень генетичної консолідованості, генетичної варіабельності та ступінь селекційного впливу. Зростання показника гетерозиготності можна очікувати за умови підвищеної пристосованості риб до конкретного середовища. Зниження рівня гетерозиготності (як і його надмірне зростання) є несприятливим для нормального функціонування популяції [1].

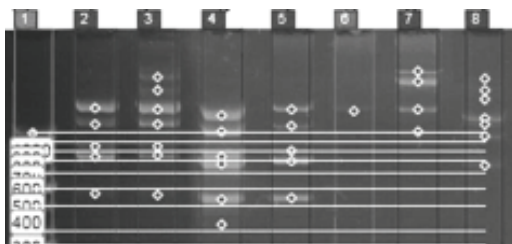


Рис. 1. Електрофореграма ISSR-PCR-продуктів ДНК крові коропа, отриманих з використанням праймера $(AGC)_6C$: 1 — маркер молекулярної маси 50 bp; 2–8 — різні особини

ампліконів завдовжки 1100 та 750 п.о.: у рамчастих коропів амплікон завдовжки 1100 п.о. — 20, у лускатих — 40%. Амплікон 750 п.о. у рамчастих коропів траплявся з частотою 70, у лускатих — 20%.

Фрагмент завдовжки 1440 п.о. виявлено у 100% особин лускатих коропів і у 90 % рамчастих. Можливо, в подальших дослідженнях буде встановлено, що він є специфічним для представників цього типу.

На особливу увагу заслуговує фрагмент завдовжки 2200 п.о., який був у 100% антонінсь-

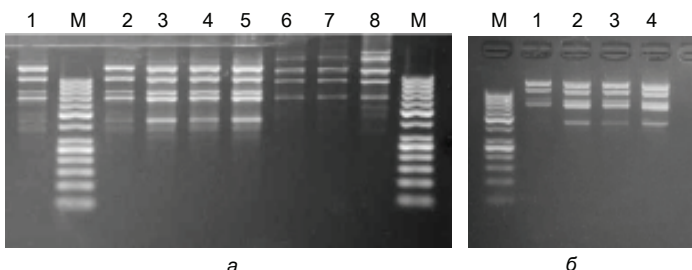


Рис. 2. Електрофореграма ISSR-PCR-продуктів ДНК коропа (а — луската порода; б — рамчаста порода), отриманих з використанням праймера $(AGC)_6G$: 1–8 — різні особини; М — маркер молекулярної маси 50 bp

У коропів найвищий рівень гетерозиготності виявлено за локусом *SOD* (у лускатих — 0,829, у рамчастих — 0,821), а найнижчий — за локусами *EST* (у лускатих — 0,539 і *TF* (у рамчастих коропів — 0,427) (табл. 2).

Рівень гетерозиготності був вищим від очікуваного у порід коропа за локусами *MDH*, *ME*, *ALB*, *CA*, *SOD* і *KAT* ($P < 0,001-0,05$), оскільки виявлено достовірний надлишок гетерозиготних особин, що свідчить про деякі процеси генетичної консолідації, які відбуваються у цій популяції.

Для оцінки геномної варіабельності рамчатої і лускатої порід коропа проаналізовано генетичну структуру популяції за використання 4-х ISSR-маркерів. З усіх використаних праймерів найінформативнішим для виявлення поліморфних локусів ДНК крові коропів антонінсько-зозуленецького типу був праймер $(AGC)_6C$. Під час проведення ISSR-аналізу за праймером $(AGC)_6C$ отримано 35 ампліконів, більшість яких виявлено у досліджених особин коропа обох порід (рис.1).

На увагу заслуговують фрагменти завдовжки 529 пар основ (п.о.) (траплявся з частотою 50%) і 1281 п.о. (30%), лише для цих ампліконів фіксувалася специфічність до однієї з двох порід з високою частотою.

Виявлено значні частотні відмінності між двома породами коропа за частотою зустрічальності

ко-зозуленецьких рамчастих та відсутній у лускатих коропів.

Під час порівняння спектра ампліконів за використання праймера $(AGC)_6G$ у лускатої і рамчатої порід коропа було отримано 26 фрагментів різної довжини (рис. 2). Для лускатої породи характерними виявилися 4 амплікони: 809 п.о. (20%), 783 (20%), 1062 (20%) та 1369 п.о. (40%). Для рамчатої породи характерними були 2 амплікони: 474 п.о. (20%) та 772 п.о. (10%).

За використання цього праймера виявлено відмінності між лускатою та рамчатою породами за частотою зустрічальності ампліконів завдовжки 711 і 1030 п.о.: у рамчастих коропів для фрагмента 711 п.о. частота становила 10%, у лускатих коропів — 40%. Для амплікону 1030 п.о. цей показник становив 60 і 20% відповідно.

Фрагмент завдовжки 1233 п.о. виявлено у 100% особин рамчастих коропів та 90% лускатих, а фрагмент 444 п.о. — у всіх особин лускатих коропів і не виявлено у рамчастих.

Під час вивчення поліморфізму ДНК в обох порід за використання праймерів $(CTC)_6C$ і $(GAG)_6C$ було отримано 6 ампліконів. На увагу заслуговує фрагмент завдовжки 1573 п.о., який був лише у рамчастих коропів (у 20% особин), інші амплікони виявлено в обох порід коропа в кількості не більше як 1 для всієї вибірки. Отже, ці праймери для проведення наших досліджень виявилися малоінформативними.

Висновки

У коропів українських порід проаналізовано генетичну структуру за використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів, а саме, генетико-біохімічних систем — TF, ALB, EST, MDH, ME, CA, SOD, KAT та ДНК-маркерів за використання праймерів — (CTC)₆C, (AGC)₆C, (AGC)₆G, (GAG)₆C. Виявлено породоспецифічні особливості генетичної структури коропів антонінсько-зозуленецького типу, а саме, відмінності за частотою алельних варіантів локусів MDH та KAT. Співвідношення фактично виявлених генотипів за локусом TF наближалось до теоретично розрахованого у коропів лускатої і рамчастої порід. За локусом EST у рамчастих коропів, на відміну від лускатих, спостерігався статистично достовірний надлишок гетерозигот, як і вияв-

лений за локусами ALB, MDH, ME, CA, SOD і KAT у лускатих і рамчастих коропів помітний надлишок гетерозиготних особин. Під час проведення аналізу генетичної структури українських порід коропа за використання ДНК-маркерів визначено 2 специфічні амплікони за праймерами (AGC)₆C та (AGC)₆G: фрагмент завдовжки 2200 п.о. ((AGC)₆C), який був у 100% антонінсько-зозуленецьких коропів рамчастої породи та якого не було в лускатих коропів, а також фрагмент 444 п.о. ((AGC)₆G) — був у всіх особин лускатих коропів і не виявлено у рамчастих.

Очевидно, що виявлену специфічність ампліконів надалі можна використати для генотипування особин лускатої і рамчастої порід коропа антонінсько-зозуленецького типу.

Бібліографія

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях/Ю.П. Алтухов. — М.: Наука, 1989. — С. 328.
2. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике/Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова//Генетика. — 2002. — Т. 38, № 9. — С. 1173–1195.
3. Генетика изоферментов/[Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовник и др.]. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
4. Генетическое разнообразие и дифференциация отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio* L.), выявляемая с помощью RAPD-маркеров/Р.И. Луданный, Г.Г. Хрисанфова, В.А. Васильев и др.//Генетика. — 2006. — Т. 42, № 8. — С. 1121–1129.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез: теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле/Г. Маурер. — М.: Мир, 1971. — 247 с.
6. Методичні рекомендації з проведення генетичної експертизи плідників коропа/[С.І. Тарасюк, В.В. Бех, Т.А. Нагорнюк, С.В. Рекрут]. — К.: Ін-т рибного госп-ва НААН, 2011. — 22 с.
7. Плохинский Н.А. Биометрия/Н.А. Плохинский. — М.: Изд-во Москов. ун-та, 1970. — 367 с.
8. Полиморфизм микросателлитных 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.
9. Слуквин А.М. Генетическая идентификация стерляди, выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области, по микросателлитным маркерам/А.М. Слуквин, О.Ю. Конева, М.И. Лесюк//Молекулярная и прикладная генетика. — 2009. — Т. 9. — С. 146–152.
10. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения/Г.Е. Сулимова//Успехи современной биологии. — 2004. — Т. 124, № 3. — С. 260–271.
11. Харченко П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко. — М.: Воскресение, 2006. — 480 с.
12. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations/A. Perez-Ruzafa, M. Gonzalez-Wanguemert, P. Lenfant [et al.]/Biological conservation. — 2006. — № 129. — P. 244–255.
13. Gahne B. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle/B. Gahne, R. K. Juneja, J. Grolmus//Anim. Blood Groups Biochem. Genet. — 1977. — V. 8. — P. 127–137.
14. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish/J.B. Shaklee, F.W. Allendorf, D.C. Morizot [et al.]/Trans. Amer. Fish. Soc. — 1990. — V. 119. — P. 2–15.
15. Hunter R.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels/R.L. Hunter, C.L. Markert//Science. — 1957. — V. 125, № 3261. — P. 1294–1295.
16. Microsatellite DNA marker analysis of genetic diversity in wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations/D. Li, D. Kang, Q. Yin [et al.]/Journal of Genetics and Genomics. — 2007. — V. 34 (11). — P. 984–993.
17. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals/M. Nei//Genetics. — 1978. — V. 89. — P. 583–590.
18. Population genetic structure of a nonmigratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination/S.A. Roark, D. Nacci, L. Coiro [et al.]/Environmental Toxicology and Chemistry. — 2005. — V. 24, Issue 3. — P. 717–725.
19. Swofford D.L. Biosys-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics/D.L. Swofford, R.B. Selander//J. Heredity. — 1981. — V. 72. — P. 281–283.

Надійшла 26.06.2013.