

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ МАРКЕРАМИ

П. Д. Мендришора, О. В. Залоїло

Інститут рибного господарства НААН

Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм райдужної форелі господарства «Ішхан» за мікросателітними локусами MFW 15, MFW 23, Hmo 02, Hmo 33. Для кожного з використаних праймерів підібрано оптимальні умови проведення ПЛР. На підставі розрахунку алельних частот визначено показники гетерозиготності. Значення наявної гетерозиготності за мікросателітними локусами були близькими до очікуваного. Найвищий рівень наявної гетерозиготності було зафіксовано за локусом Hmo 02 (0,69), найнижчий — 0,51, за локусом MFW 23.

Сучасне рибництво є одним з найперспективніших напрямів аграрного виробництва. На сьогодні в Україні сформовані локальні племінні стада поширених та окремих нових об'єктів риборозведення, які, на даний час, вважаються пріоритетними для розвитку селекційно-племінної роботи у вітчизняній аквакультурі. Разом з тим, високий рівень інбридингу та інші фактори призводять до поступового зменшення репродуктивних показників, погіршення породних якостей та зниження резистентності риб до захворювань чи несприятливих зовнішніх чинників середовища. При цьому використання лише традиційних селекційних методик, зокрема на основі морфометричних вимірів, часто є недостатньо ефективним для формування селекційних груп риб. У результаті цього через декілька поколінь можуть виникати втрати типових селекційних ознак певних племінних груп риб у межах окремих господарств [1, 2]. Тому для підтримання оптимальних характеристик породи або внутрішньопородних типів об'єктів культивування слід оперувати інформацією про генетичну структуру локальних племінних груп риб. Очевидно, що аналіз рівня внутрішньовидової поліморфності на рівні породи, популяції, стада чи окремих особин найбільш ефективно може проводитись з використанням молекулярно-генетичних маркерів (МГМ) [3, 4].

Мікросателіти часто виявляються локусами, здатними до швидких мутацій, що дозволяє ефективно використовувати їх для виявлення розбіжностей між спорідненими популяціями у рибництві. Дослідження достатньої кількості мікросателітних локусів та кількості повторів у них дозволяє отримати унікальну інформацію про генетичну структуру на рівні особини, визначити число алельних варіантів та частоти алелів у популяціях, вивчити спадкові зв'язки між особинами [5, 6].

Метою роботи було дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму райдужної форелі господарства «Ішхан» за мікросателітними локусами.

Матеріали і методи. Як матеріал для досліджень використовували зразки крові, відібраної з хвостової вени 30 особин райдужної форелі господарства «Ішхан» Чернівецької області. Тотальну ДНК виділяли за стандартною методикою з використанням набору Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit. Концентрацію та якість очищеної ДНК вимірювали на біофотометрі Eppendorf Bio Photometr. Для дослідження поліморфізму використовували чотири мікросателітні локуси: MFW 15, MFW 23, Hmo 02, Hmo 33 (табл. 1).

ПЛР проводили на ампліфікаторі “Termo scientific” за таким температурним режимом: 5 хв за 94 °С; 33 цикли: 1 хв за 94 °С, 30 с за 53–56 °С (залежно від локусу), 30 с за 72 °С; 5 хв за 72 °С. Реакційна суміш, об'ємом 25 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ

(NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. *Tag*-полімерази, 50 нг ДНК, 1,7 мМ MgCl₂ та по 0,2 мкМ праймерів. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 3 % агарозному гелі з використанням 1×ТАЕ-буферу.

Таблиця 1

Праймери, використані для проведення мікросателітного аналізу

Локуси	Послідовність праймерів
МFW 15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTC R: GTTCACAAGGTC ATT TCCAGC
МFW 23	F:GTATAATTGGGAGTTTTAGGG R:CAGGTTTATCTCCSTTCTAG
Нмо 02	F: CATCTGTTCTGAGGGGCTGAG R: CCCCACTTTACCACCAATTATTAT
Нмо 33	F: TGCAGCAGTATGTGAATCAGGACAC R: GTGCTTCGGGATACCACACTCTTG

Обробку та аналіз гелів проводили за допомогою програми TotalLab v2.01. Частоту кожного амплікону за певним локусом визначали як відсоток від загальної кількості ампліконів за даним локусом [7]. Статистичну обробку отриманих результатів виконували з використанням комп'ютерної програми "Biosys-1" та Excel.

Результати й обговорення. Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм райдужної форелі господарства «Ішхан» за мікросателітними локусами: МFW 15, МFW 23, Нмо 02, Нмо 33. Підібрано оптимальні умови проведення SSR-PCR аналізу. Для отримання чітких та відтворюваних алелів індивідуально підібрано умови ампліфікації для роботи з окремими геномами. Проведені дослідження дозволили визначити чинники, які найбільшою мірою впливали на ефективність ампліфікації SSR-алелів райдужної форелі: концентрація препарату ДНК, концентрація праймера у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації. З огляду на це, для кожного з використаних праймерів було підібрано оптимальні умови проведення ПЛР. Приклад отриманих SSR-спектрів райдужної форелі наведено на рисунку.

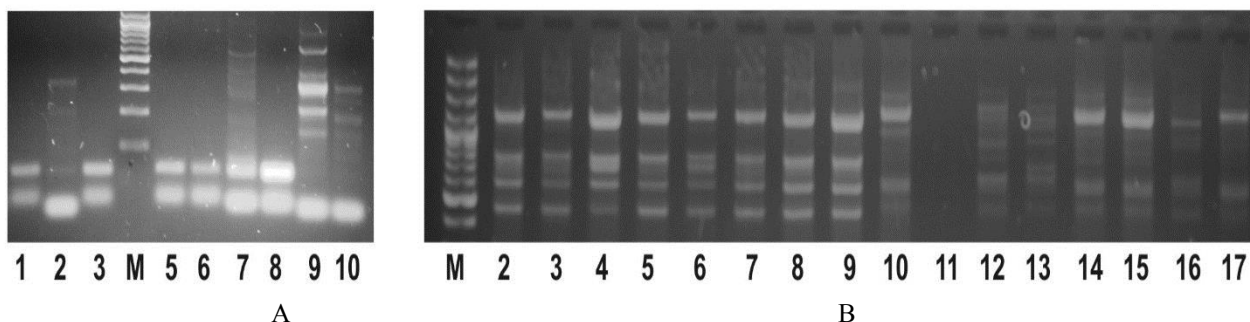


Рис. SSR-аналіз генетичного поліморфізму райдужної форелі за локусами Нмо 02 (А; 1-10 -досліджені зразки, М-маркер) та МFW 15 (В; М- маркер, 2-17 – досліджені зразки)

Сумарно при використанні чотирьох SSR-локусів у досліджених особин виявлено 43 алеля, молекулярний розмір яких становив 924–102 п.н.

За всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами було виявлено поліморфізм. Найбільшу кількість алелів для цього типу маркерів було отримано при ампліфікації локусу Нмо 02 (15), найменшу — для локусу МFW 23 — 4. Середня кількість алелів на локус знаходилася в межах від 2,98 (Нмо 02) до 2,56 (МFW 23) (табл. 2).

На підставі розрахунку алельних частот визначено показники гетерозиготності. Значення наявної гетерозиготності за мікросателітними локусами були близькими до очікуваного. Найвищий рівень наявної гетерозиготності було зафіксовано за локусом Нмо 02 (0,69), найнижчий – 0,51, за локусом МFW 23.

Число алелей та показники гетерозиготності при дослідженні поліморфізму райдужної форелі

Локуси	Число алелей	Середнє число алелів на локус	Ho	He
MFW 15	14	2,93	0,59	0,66
MFW 23	4	1,56	0,48	0,51
Hmo 02	15	2,98	0,62	0,69
Hmo 33	10	2,52	0,56	0,62

В И С Н О В К И

1. Досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм райдужної форелі господарства «Ішхан» за мікросателітними локусами: MFW 15, MFW 23, Hmo 02, Hmo 33. Підібрано оптимальні умови проведення SSR–PCR аналізу.

2. За всіма дослідженими молекулярно-генетичними маркерами виявлено поліморфізм. На підставі розрахунку алельних частот визначено показники гетерозиготності. Значення наявної гетерозиготності за мікросателітними локусами були близькими до очікуваного. Найвищий рівень наявної гетерозиготності було зафіксовано за локусом Hmo 02 (0,69), найнижчий — 0,51, за локусом MFW 23.

Перспективи подальших досліджень. Подальші наукові дослідження спрямовані на підбір молекулярних маркерів, що дозволить провести моніторинг генетичних процесів у популяціях райдужної форелі.

ANALYZE OF THE GENETIC POLYMORPHISM IN RAINBOW TROUT USING MICROSATELLITE MARKERS

P. Mendrisha, O. Zaloilo

Institute of Fisheries of NAAS

S U M M A R Y

The molecular-genetic polymorphism of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from fish-farm ISHHAN has been investigated by using four microsatellite loci: MFW 15, MFW 23, Hmo 02 and Hmo 33. Optimal conditions of PCR-analysis were determined for everyone of the primers. Based on the calculation of allelic frequencies the main parameters of the genetic variability of investigated fish species were measured. The values of observed hetero-zygosity using microsatellite loci were close to the expected. The highest level of observed hetero-zygosity was fixed in locus Hmo 02 (0.69), the lowest — 0.51 with locus MFW 23.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

П. Д. Мендришора, О. В. Залоило

Институт рыбного хозяйства НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Исследован молекулярно-генетический полиморфизм радужной форели хозяйства «Ишхан» по микросателлитным локусам MFW 15, MFW 23, Hmo 02, Hmo 33. Для каждого из использованных праймеров подобраны оптимальные условия проведения ПЦР. На

основании расчета аллельных частот определены основные показатели генетической изменчивости исследованных рыб. Значения наблюдаемой гетерозиготности по микросателлитным локусам были близкими к ожидаемой. Самый высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности был зафиксирован по локусу Hmo 02 (0,69), самый низкий — 0,51, по локусу MFW 23.

ЛІТЕРАТУРА

1. Грициняк І. І. Актуальні завдання генетичних досліджень у рибному господарстві / І. І. Грициняк, С. І. Тарасюк // Проблеми розвитку морської та прісноводної аквакультури : матеріали семінару. Державний комітет рибного господарства України. — К., 2009. — С. 98–106.
2. Гринжевський М. В. Організація селекційно–племінної роботи в рибництві / М. В. Гринжевський, І. М. Шерман, І. І. Грициняк. — К. : Рибка моя, 2006. — 352 с.
3. Zhang Xiao–Gu. Applications of microsatellite markers in studies of genetics and breeding of fish. / Xiao–Gu Zhang, Jin–Gou Tong, Bang–Xi Xiong // Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. — 2006. — № 3. — P. 83–87.
4. Javier P. Development of a microsatellite genotyping tool for the fish Gilthead seabream (*Sparus aurata*): applicability in population genetics and pedigree analysis. / P. Javier, M. Jose, B. Julia // Aquaculture Research. — 2010. — № 41. — P. 1514–1522.
5. Isolation and characterization of microsatellite loci in the fish *Coilia mystus* (Clupeiformes: Engraulidae) using PCR–based isolation of microsatellite arrays. / J. Yang, X. Zhou, D. Liu [et al.] // Genet. Mol. Res. — 2011. — № 10 (3). — P. 1514–1517.
6. Дубін О. В. Мікросателітні маркери у дослідженні генетичного поліморфізму російського осетра / Вісник аграрної науки Причорномор'я. — 2012. — Випуск 4, т. 2, ч. 1. — С. 70–73.
7. 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.