

11. **Geldermann H.** *Genome analysis in domestic animals. Genetics.* 1994. № 134. P. 943-951
12. [hppt://omia.angis.org.au](http://omia.angis.org.au)
13. <http://www.grg.org/www.genome.gov>
14. **Korpelainen H., Kostamo K., Virtanen V.** *Microsatellite marker identification using genome screening and restriction-ligation. Biotechniques.* 2007. 42. P. 479-486
15. **Olivier, M., Meehl, M.A., Lust, G.** *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) as markers for canine genetic studies. The Am. Genet. Assoc.* 90: 78-82.1999
16. **Parker H.G., Kim L.V., Sutter N.B., Carlson S., Lorentzen T.D. et al.** *genetic structure of the purebred domestic dog. Science.* 2004. 304. 1160-1166
17. **Rothuizen i Van Wolferen, Rothuizen J., Van Wolferen M.** *Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. Anim Genet* 1994; 25:13-18.
18. **Schneider P.M., Seo Y., Rittner C.** *Forensic mitDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. International Journal of Legal Medicine.* 1999. V.112, P.315-316
19. **Silvia Llambi, Rosa Gagliardi, Monica Martinez, et al.** *Analyses of two populations of the uruguayan canine breed Cimarron (Canis familiaris) using RAPD markers. Rev.MVZ Cordoba* 13(3):1464-1468, 2008
20. **Stepniak E., Zagalska M., Switonski M.** *Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. J Appl Genet* 2002; 43(4):489-499.
21. **Stepniak Zagalska, Świtoński Stepniak E., Zagalska M, Switonski M.** *Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. J Appl Genet* 2002; 43(4):489-4997
22. **Switonski M., Rogalska-Niznik N., Szczerbal I., Baer M.** *Chromosome polymorphism and karyotype evolution of four canids: the dog, red fox, arctic fox and raccijn dog. Caryologia.* 2003. V. 56. 4. P. 375-385.
23. **Vos P.** *AFLP™ fingerprinting of Arabidopsis. // Methods Mol. Biol. – 1998. Vol.82. – P. 147–155*
24. **Wurster D., Benirschke K.** *Comparative cytogenetic studies in the order Carnivora. Chromosoma.* 1968. V. 24. №3. P. 336.
25. **Zolgharnein H., Salari-Aliabadi M. A., Forougmand A. M., Roshani S.** *Genetic population structure of Hawksbill turtle (Eretmochelys imbricata) using microsatellite analysis // Iranian journal of biotechnology, 2011. – Vol. 9. –No. 1. – P. 56 – 62*

А.МАРІУЦА, канд.с.-г.наук

Н.БОРИСЕНКО, наук.співробітник

Інститут рибного господарства НААН

Використання ДНК-маркерів – один з перспективних напрямів дослідження геному, що дає змогу вирішувати не лише фундаментальні, а й практичні завдання. Напрямок досліджень знайшов своє застосування при вивченні генофонду різних видів сільськогосподарських тварин і використання специфіки їхніх генотипів у селекційно-племінній роботі.

Виявлення поліморфізму методом ISSR-PCR допомогло встановити певну специфічність спектра ампліконів, залежно від досліджуваного праймера. У вивченій породі строкатого товстолоба мікросателітні послідовності ядерної ДНК мають різний ступінь консервативності [6,7]. Виявлені послідовності ДНК можуть бути частиною так званих геноспецифічних локусів, що, у свою чергу, відкриває перспективи для пошуку кореляцій з кількісними і якісними ознаками.

У дослідженнях використовували особин строкатого та білого товстолоба, що відтворюється в умовах ДП рибгосп «Галицький» Івано-Франківська обл., м. Бурштин.

Білий товстолюб (*Hyporhamphichthys molitrix*) – один з найпоширеніших та наймасовіших об'єктів у прісноводній аквакультурі України. Завдяки характеру спектра живлення фітопланктофаг відноситься до групи рослиноїдних риб, до якої входять ще й такі види як строкатий товстолюб, їх гібриди та білий амур [8]. Рослиноїдні риби важливі об'єкти аквакультури, їх вирощують у ставових господарствах, на теплих водах електростанцій, вселяють у природні водойми та водосховища.

Цей традиційний представник з далекосхідних азійських річок, що впадають у Тихий океан, завезений у водойми України для освоєння вільного ланцюга живлення – фітопланктофага, і в ставові господарства з метою розведення у полікультурі на початку 1960-х років двічі – з р. Амур та з р. Янцзи, широко розселюється із ставових господарств по всіх рівнинних водоймах. Першочерговим завданням при освоєнні виду у нових умовах було розроблення способів штучного відтворення. З 1958 по 2006 рр. в Україні одержано 6 послідовних поколінь селекції білого товстолоба на пристосованість до заводських технологій [9].

Товстолюб строкатий (*Aristichthys nobilis*) – відрізняється від свого родича білого товстолюби-

Рецензенти: докт. с.-г. наук **К.В.Копилов**, Інститут розведення і генетики НААН; докт. с.-г. наук **М.І. Гиль**, Миколаївський аграрний університет.

Генетична структура строкатого і білого товстолобика

за використання ДНК маркерів (ISSR-PCR)

Анотація. За використання ISSR-PCR методики проведено аналіз генетичної структури білого та строкатого товстолобика, а також показано інформативність даного методу для виявлення генетичного поліморфізму популяцій.

Ключові слова: поліморфізм, ДНК-маркери, білий товстолобик, строкатий товстолобик.

Comparative characteristics of genetic structure of white and bighead carps by using of DNA markers (ISSR-PCR). A.E. MARIUTSA, N.O. BORISENKO.

Abstract. With help of ISSR-PCR technique has been analyzed genetic structure of white and bighead carps and illustrated the informativeness of given method for identification of populations genetic polymorphism.

Key words: polymorphism, DNA-markers, white carp, bighead carp.



ка темнішим забарвленням і темними плямами на боках, більшою головою, невеликим кілем на черевці. Личинки живляться дрібним зоопланктоном. Росте швидше від білого товстолобика, досягає 1,5 кг у дворічному віці, а 2,5 кг у трирічному віці. У водоймах-охолоджувачах електростанцій досягає маси до 45 кг і більше, щорічний приріст – 2–3 кг. Молодь строкатого товстолобика також одержують в інкубаційних апаратах. Нерест у природних умовах не відбувається [10].

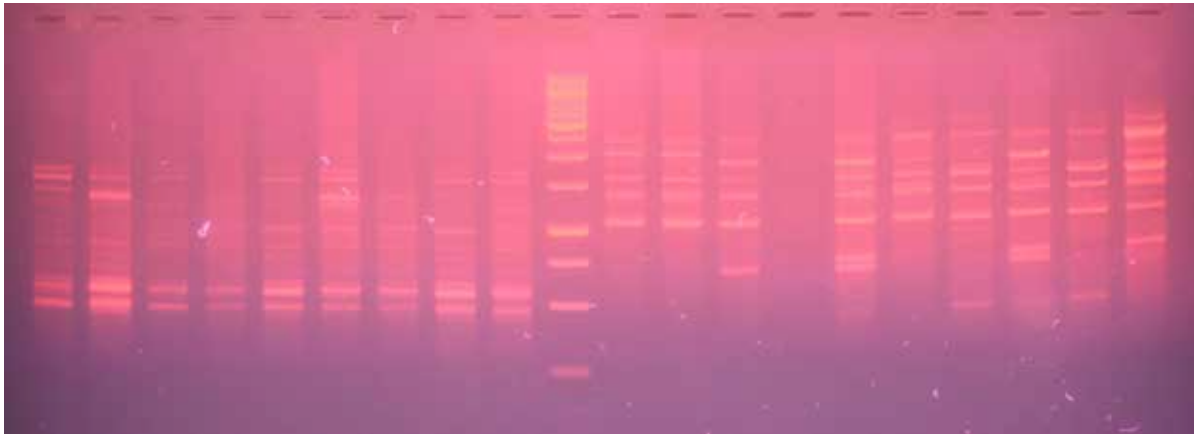
Для дослідження було відібрано зразки крові з хвостової вени. В якості консерванту використовували гепарин. Відібрану кров фракціонували центрифугуванням впродовж 10 хвилин. Отримані фракції плазми крові, лейкоцитів та еритроцитів

фасували по епендорфам заморожували і зберігали за температури -18°C .

ДНК виділяли з цільної крові риб за допомогою набору реагентів «Diatom DNA Prep 100» згідно з рекомендаціями виробника.

ПЛР здійснювали за допомогою стандартного набору для проведення полімеразної ланцюгової реакції «GenePak PCR Core» («Лаборатория Изоген»).

Для проведення ПЛР використовували ампліфікатори «Mastercycler» (Eppendorf). У пробірці з ліофілізованою сумішшю, що містила 1 од. Taq-полімерази, 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатів, 2,5 мМ MgCl_2 , вносили 5 мкл (20нг) геномної ДНК, 5 мкл 0,2 мМ праймера, 10 мкл



Електрофоретичний спектр ампліконів у білого товстолоба (ISSR-PCR), отриманий за використання праймера $(AGC)_6C$ – доріжки № 1–9; маркер молекулярної маси–10; за використання праймера $(ACC)_6G$ – доріжки 11-20.

ПЛР-розчину. Реакцію проводили в наступному режимі: перший етап – денатурація 2 хв при $95^{\circ}C$; наступні 35 циклів: 30 с при $94^{\circ}C$, 30 с при $58^{\circ}C$, 2 хв при $72^{\circ}C$; термінальна елонгація 10 хв при $72^{\circ}C$; охолодження при $4^{\circ}C$. Продукти ПЛР аналізували методом електрофорезу, який проводили у 2% агарозному гелі. Візуалізацію молекул ДНК здійснювали в ультрафіолетовому випромінюванні на транслюмінаторі Caution (Франція) за допомогою барвника бромистого етидію (0,5 мг/мл гелю) з наступним фіксуванням електрофореграм цифровою камерою Canon EOS 450D (Японія). Визначення генотипів зразків здійснювали за допомогою маркера молекулярних мас 1-kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Встановлення поліморфізму ДНК відібраних об'єктів досліджень проводили шляхом аналізу спектра отриманих ампліконів. Для одержання матричного спектра у ISSR-PCR-методиці були використані праймери, структура яких давала змогу оцінити гетерогенність представленої популяції (чотирискладові праймери містили 1 якір і 3 тринуклеотиди).

Статистичну обробку та аналіз даних гелів проводили за допомогою програми TotalLab V2.01. [11].

Результати досліджень. Аналіз одержаних спектрів продуктів ампліфікації допоміг виявити подібність та відмінність у розподілі фрагментів різної довжини (ампліконів) у популяції білого і строкатого товстолоба.

Спектр ампліконів у кожної із дослідженої особи містив від 2 до 10-ти локусів залежно від дослідженого праймера. Розмір ампліконів варіював у межах від 80 п.н. до 3000 п.н. Сумарно за всіма праймерами виявлено 345 ампліконів, 182 – у строкатого товстолоба, 163 – у білого товстолоба. Найбільша кількість – 52 амплікони

містив спектр продуктів ампліфікації, одержаний з використанням праймера $(AGC)_6C$ у строкатого товстолоба. За рештою праймерів кількість ампліконів варіювала від 3–10. Загалом, за всіма дослідженими особинами з використанням $(CTC)_6$ праймера виявлено 65 – ампліконів, $(AGC)_6G$ – 78 ампліконів, $(ACC)_6G$ – 86 ампліконів, $(AGA)_6C$ – 88 ампліконів. Праймер $(GAG)_6C$ виявився малоінформативним як для білого, так і строкатого товстолоба.

Звертає на себе увагу розподілення фрагментів однакової довжини, які увійшли в аналіз білого та строкатого товстолобів. Амплікони довжиною 3000 п.н., 2500 п.н., 2000 п.н., 1000 п.н. присутні у спектрах продуктів ампліфікації всіх чотирьох праймерів і були загальними лише для білого та строкатого товстолоба, а амплікон в 250 п.н. $(GAG)_6C$ був загальним лише для строкатого товстолоба.

Не за всіма локусами, дослідженими за допомогою вказаних праймерів, виявили високий ступінь поліморфізму (рис.).

При аналізі популяційно-генетичної структури, за мікросателітними ДНК-маркерами популяції строкатого товстолоба за всіма локусами, дослідженими за допомогою вказаних праймерів, виявили високий ступінь поліморфізму.

У результаті аналізу продуктів ISSR-ампліфікації із застосуванням праймера $(CTC)_6G$ сумарно виявлено 26 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 1000-500 нуклеотидів. Спектри включали від 1 до 9-ти ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 34,6% – 500 п.н.

Сумарно в результаті проведеного аналізу при використанні праймера $(GAG)_6C$ виявлено 28 продуктів ампліфікації, в межах розподілу 250-80 нуклеотидів. У популяції строкатого товстолоба виявлено за праймером $(GAG)_6C$ – 10-8 ампліко-

нів. Кількість ампліконів спектра становила 35,7% – 250 п.н.

У результаті проведеного аналізу при використанні праймера (AGC)₆G виявлено 39 продуктів ампліфікації в межах розподілу 2000-350 нуклеотидів. У популяції строкатого товстолобика встановлено за праймером (AGC)₆G – 1-10 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 17,9% – 350 п.н.

При використанні праймера (ACC)₆G зафіксовано 37 продуктів ампліфікації, в межах розподілу 2000-450 нуклеотидів. У популяції строкатого товстолобика виявлено за праймером (ACC)₆G – 1-5 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 13,5% – 650-550п.н., 500п.н., 450 п.н.

Праймер (AGC)₆C мав 52 продукти ампліфікації в межах розподілу 2500-400 нуклеотидів. У популяції строкатого товстолобика було за праймером (AGC)₆C – 1-10 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 19,2% – 550п.н., 480п.н., 400 п.н.

У популяції білого товстолоба за праймером (CTC)₆G сумарно встановлено 39 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 2500-750 нуклеотидів. Спектри включали від 1 до 9-ти ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 23% – 750 п.н.

При використанні праймера (AGC)₆G сумарно виявлено 39 продуктів ампліфікації в межах розподілу 3000-500 нуклеотидів. У популяції білого товстолобика було 10-9 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 23% – 500 п.н.

Проведеним аналізом показав, що при використанні праймера (ACC)₆G виявлено 49 продуктів ампліфікації, в межах розподілу 2000-500 нуклеотидів. У популяції білого товстолобика за праймером виявлено – 2-9 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 18,3% – 1500 п.н., 1300п.н., 1000п.н.

При використанні праймера (AGC)₆C виявлено 36 продуктів ампліфікації в межах розподілу 2000-500 нуклеотидів. У популяції білого товстолобика за праймером (AGC)₆C – 2-9 ампліконів. Кількість ампліконів спектра становила 25% – 550п.н., 500 п.н.

Висновки

У процесі проведених досліджень встановлено, 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.

Зважаючи на відносну простоту ISSR-PCR методу та незначні витрати для проведення досліджень із його використанням, такий аналіз є перспективним при дослідженні популяцій риб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Глазко В.И., Г.В. Глазко. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболитика: учеб.пос; ред. Т.Т.Глазко.- К.: КВЦ, 2003.- 640 с.
2. Zietkiewicz E, A. Rafalski, D. Labuda. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. – 1994. – V. 20. – № 2. – P. 176-183.
3. Y. J. Edwards, G. Elgar, M. S. Clark [et al.]. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J. Molec. Biol.* — 1998. — Vol. 278. — P. 843—854.
4. L. You-Chun, B. Korol. Abrahaml, T. Fahima et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. — 2002. — Vol. 11. — P. 2453—2465.
5. Manninen O, Kalendar R., Schulman A.H. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics*. – 2000. – 264. – N 3. – P. 325-334.
6. Baldi P., Basnee P.F. Sequence analysis by additive scale: DNA structure for sequences and repeats of all lengths. *Bioinformatics*. — 2000. — Vol. 16. — P. 865 — 889.
7. Abot P. Individual and population variation in vertebrates revealed by Intersimple sequence Repeats (ISSRs). *J. Insect Sci.* — 2001. — Vol. 1, № 8. — P. 15—18.
8. Гринжєвський М.В., Шерман І.М., Грициняк І.І. та інші. Організація селекційно-племінної роботи в рибництві. – К.: Рибка моя, 2006.– 340 с.
9. Грициняк І.І., Гринжєвський М.В.,Третяк О. М., та ін. Фермерське рибництво.– К.: Герб, 2008.–560 с.
10. Демченко И. Ф., Носаль А.Д., Приходько В.А. К. Разведение растительноядных рыб. «Урожай». 1976, стр.64 (на украинском языке).
11. <http://www.totallab.com>.

