
СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА НОВОГО МАЛОЛУСКАТОГО ВНУТРІШНЬОПОРІДНОГО ТИПУ КОРОПА НА ОСНОВІ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ДНК-МАРКЕРІВ

В.В. Бех

Інститут рибного господарства НААН України, м. Київ

Матеріал трьох заводських ліній нового малолускатого внутрішньопорідного типу української рамчастої породи коропа був досліджений на мітохондріальну мінливість. Встановлено, що генетичні маркери, які були використані у дослідженні, можуть бути ефективно застосовані при визначенні помісей у випадку внутрішньовидової гібридизації або у випадку значних генетичних розбіжностей.

Дослідження генетичної структури нового внутрішньопорідного типу української рамчастої породи коропа, особливо на завершальному етапі його створення, відіграють значну роль у формуванні цілісності селекційного процесу та виявленні певних перспектив подальшого розвитку. У попередніх генетичних дослідженнях основна увага здебільшого приділялась класичним генетичним дослідженням, що обмежувались вивченням мінливості за локусами трансферину та ряду інших поліморфних систем [1–2]. У цілому генетику популяції коропа на рівні алозимів вивчало багато авторів [3–5], тоді як дослідження з використанням мітохондріальної ДНК були введені у наукову практику лише недавно [6–7]. За результатами цих досліджень в окремих випадках було ідентифіковано принаймні 2 генетичні групи — європейський та східно-азійський генотипи [8].

У запропонованій роботі, яку було виконано за фінансової підтримки NATO Security Through Science Programme у Лейбніц-Інституті прісноводної екології та внутрішнього рибного господарства (Берлін, Німеччина), вперше у вітчизняній рибогосподарській науці зроблена спроба визначити місце українських коропів серед європейських та азіатських генотипів з використанням сучасних мітохондріальних ДНК-маркерів та бази

даних, що накопичена провідними лабораторіями світу з цього питання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для досліджень були використані три заводські лінії малолускатого внутрішньопорідного коропа української рамчастої породи — нивківська, лебединська та закарпатська. У 10 представників кожної лінії, вікової групи К0+ були відібрані взірці плавців, що були зафіксовані у 96°-му етанолі. Загальна геномна ДНК була ізольована за спрощеним методом Laird та ін. (1991) [9]. Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP) був проведений у двох полімеразних ланцюгових реакціях (ПЛР) шляхом ампліфікації сегментів, що охоплювали зону гена НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат)-3,4 дегідрогенази (ND-3/4) та НАДФ-5,6 дегідрогенази (ND-5/6). Пари праймерів для ампліфікації цих генів були сконструйовані на основі завершеної секвенції мітохондріальної ДНК *Cyprinus carpio* L., 1758 [10]:

ND-3/4-a: 5'-AAA GTT AGT ACA AGT
GAC TTC CAA-3'

ND-3/4-b: 5'-TTT TGG TTC CTA AGA
CCA ACG GAT-3'

ND-5/6-a: 5'-AAC AGT TCA TCC GTT
GGT CTT AGG-3'

ND-5/6-b: 5'-TAA CAA CGG TGG TTC
TTC AAG TCA-3'

Розмір продуктів ПЛР для цих зон становив приблизно 2400 та 2600 пар основ нуклеотидів відповідно. Кожна ПЛР реакція (50 мкл) була скомпонувана з 1 × ПЛР буфера (10 ммоль Tris-HCl, рН 8,3, 50 ммоль KCl), 1,5 ммоль MgCl₂, 0,1 ммоль dNTPs (деоксирибонуклеотид трифосфат), 0,2 мкмоль кожного праймеру та 0,5 одиниць Taq ДНК-полімерази (МВІ-Fermentas). ПЛР ампліфікація складалась з початкової денатурації за 95°C протягом 3 хв, далі відбувалось 35 циклів денатурації за 95°C протягом 30 с, відпал (ренатурація) за 55°C протягом 30 с та розтягування за 72°C протягом 1 хв. Продукти ПЛР були оброблені рестрикційними ензимами Eco47I (AvaII), BsuRI (HaeIII), HinfI, RsaI, AluI, MboI, HpaII, Hin6I (HhaI), TaqI, XbaI. Фрагменти піддані електрофорезу в 2%-му агарозному гелі з використанням системи трис-борат-EDTA (ТВЕ) буферу. Розмір рестрикційних фрагментів оцінений шляхом порівняння за ступінчастою шкалою у 100 пар нуклеотидів (МВІ-Fermentas). Композиція гаплотипів позначена на основі спостережень комбінацій рестрикційних фрагментів з використанням 10 рестрикційних ензимів на продукти ампліфікації з двох локусів.

Статистична обробка дослідних даних проведена за методикою AMOVA (analysis of molecular variance) [11] з ви-

користанням програмного продукту Arlequin (версія 2.0).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Поліморфізм у середині зони генів ND-3/4 та ND-5/6 був виявлений за 6 та 4 рестрикційними ензимами (табл. 1), при цьому варіант рестрикційної структури позначений у таблиці великими літерами. Всього, було ідентифіковано 3 різні композиції гаплотипів.

З наведених даних видно що гаплотипи типу "1" та "2" відрізняються лише за рестриктазою XbaI для зони ND-3/4. З літератури відомо, що вказані гаплотипи притаманні коропам європейського походження, тоді як гаплотип типу "3" значною мірою від них відрізняється і є характерним для азіатського підвиду коропа, зокрема для його представника — амурського сазана. Зазначена генетична особливість підтверджує наявність частки крові сазана у любінському внутрішньопорідному типі, який в свою чергу був використаний при виведенні закарпатської лінії малолускатого коропа.

Частоту гаплотипів мтДНК за заводськими лініями малолускатого коропа нового внутрішньопорідного типу подано у табл. 2. При цьому, слід зауважити, що фактична гетерозиготність за досліджени-

Таблиця 1. Композиція мтДНК гаплотипів малолускатого внутрішньопорідного типу української рамчастої породи коропа за результатами розкладу зони генів ND-3/4 та ND-5/6 за допомогою рестрикційних ензимів

Гап- тип	ND-3/4*										ND-5/6*									
	Eco 47I	Bsu RI	Hin fl	Rsa I	Alu I	Mbo I	Hpa II	Hin 6I	Taq I	Xba I	Eco 47I	Bsu RI	Hin fl	Rsa I	Alu I	Mbo I	Hpa II	Hin 6I	Taq I	Xba I
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	A	B	B	A	B	A	B	A	B	B	B	B	A	A	A	B	A	A	B	A

* Середній розмір рестрикційних фрагментів для відповідних ензимів (в парях нуклеотидів), що спостерігався у 2%-му агарозному гелі (фрагменти менші за 200 пар нуклеотидів не враховували): ND-3/4. Eco47I-A:2400; BsuRI-A:1310, 300, 250, B:1200, 300, 250; HinfI-A:950, 580, 520, B:950, 580, 480; RsaI-A:870, 500, 470, 280; AluI-A:670, 510, 470; B:670, 510, 360; MboI-A:830, 390, 340, 210 190; HpaII-A:530, 380, 340, 310, B:530, 380, 310; Hin6I-A:1750, 560; TaqI-A:1470, 890, B:1220, 890, 250; XbaI-A:2400, B:2130, 270.
ND-5/6. Eco47I-A:2380, 220, B:2600; BsuRI-A:730, 600, 540, 350, B:730, 560, 350, 260; HinfI-A:460, 340, 290, 250; RsaI-A:1660, 810; AluI-A:1310, 380; MboI-A:1490, 640, 360, B:760, 730, 640, 360; HpaII-A:2250, 300; Hin6I-A:1600, 9400; TaqI-A:1000, 690, 390, 300, B:780, 690, 390, 300, 220; XbaI-A:2600.

Таблиця 2. Розподіл гаплотипів мтДНК за заводськими лініями малолускастого внутрішньопорідного типу української рамчастої породи коропа

Заводська лінія	n	Композиція гаплотипів			Фактична гетерозиготність
		1	2	3	
Нивківська	10	0,90	0,10	0,00	0,180
Лебединська	20	0,95	0,05	0,00	0,095
Закарпатська	15	0,67	0,20	0,13	0,494

ми локусами є найвищою у закарпатської заводської лінії — 0,494.

Нивківська та лебединська заводські лінії практично не відрізняються за композицією гаплотипів від інших європейських порід та груп коропа. В подальшому необхідно продовжити дослідження у зазначеному напрямі. Особливо цікавим є виявлення генетично зумовленої диференціації у структурі коропів європейського типу, яка на сьогоднішній день, залишається практично не вивченою.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено чітку відокремленість закарпатської заводської лінії малолуска-

того внутрішньопорідного типу коропа за композицією мітохондріальної ДНК. Гаплотипи нивківської та лебединської заводських ліній цілком відповідають європейському типу та практично не різняться між собою. В подальшому, використовуючи лише кілька рестрикційних ензимів, з високою вірогідністю можна ідентифікувати рибу, що несуть у собі частку крові амурського сазана та використовувати зазначені особливості при генетичному маркіруванні. Проведення досліджень генетичної структури українських коропів на основі мітохондріальної ДНК є вкрай важливими та перспективними у подальшій ідентифікації та структуризації українських порід коропа.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бех В.В. Новый украинский малочешуйчатый карп // Рыбоводство и рыболовство. — 1997. — № 3–4. — С. 12.
2. Марценюк В.П., Романов Л.М., Бех В.В., Томіленко В.Г. Спадкова мінливість ізоферментів крові коропів різних за походженням // Таврійський науковий вісник. — Херсон, 2003. — Вип. 29. — С. 128–132.
3. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. — Л.: Наука, 1987. — 520 с.
4. Лобченко В.В., Куриный С.А., Доманчук В.И., Епур В.В. Исследование полиморфизма трансферрина у карпов Молдавии // I съезд гидробиологов Молдавии: Тез. докл., Кишинев, апрель, 1986. — Кишинев: Штиинца, 1986. — С. 83–84.
5. Anjum R. Biochemical and chromosomal genetic characteristics of several breeding population of common carp, *Cyprinus carpio* (L.). Ph.D. Thesis. Faculty of Water Protection and Freshwater Fisheries, Olsztyn University of Agriculture and Technology, Olsztyn. — 1995. — P. 68.
6. Davis K.M., Dixon P.I., Harris J.H. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of carp, *Cyprinus carpio* L., from south-eastern Australia. Mar. Freshwater Res. 50. — 1999. — P. 253–260.
7. Froufe E., Magyary I., Lehotsky I., Weiss S. mtDNA sequence data supports an Asian ancestry and single introduction of the common carp into the Danube Basin // J. Fish Biol. — 2002. — Vol. 61. — P. 301–304.
8. Kohlmann K., Gross R., Murakaeva A., Kersten P. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers — Auat. Living Resour. — Vol. 16. — 2003. — P. 421–431.
9. Laird P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. — 1991. — Nucleic Acids Res. — Vol. 19. — P. 4293.
10. Chang Y.S., Huang F.L., Lo T.B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. // J. Mol. Evol. — 1994. — Vol. 38. — P. 138–155.
11. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. — 1992. — Genetics. — Vol. 131. — P. 479–491.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА НОВОГО МАЛОЧЕШУЙЧАТОГО ВНУТРИПОРОДНОГО ТИПА КАРПА НА ОСНОВАНИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

В.В. Бех

Материал трех заводских линий нового малочешуйчатого внутривидового типа украинской рамчатой породы карпа был исследован на митохондриальную изменчивость. Установлено, что генетические маркеры, которые были использованы в исследованиях, могут быть эффективно применены при определении помесей в случае внутривидовой гибридизации, или в случае значительных генетических расхождений.

GENETIC STRUCTURE OF THE NEW SCALELESS SUBBREED TYPE OF COMMON CARP ON THE BASIS OF THE MITOCHONDRIAL DNA-MARKERS

V. Bekh

The material of three plant lines of the new Scaleless Subbreed Type of the Ukrainian Frame Breed of common carp has been investigated for mitochondrial variability. It is established, that genetic markers which have been used in investigations, can be effectively applied for detection of the hybrids in case of intraspecific hybridization or significant genetic divergences.

УДК 639.3:575

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ОКРЕМИХ ВНУТРІШНЬОПОРІДНИХ ГРУП КОРОПІВ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Т.А. Нагорнюк, І.А. Особа, С.І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН України, м. Київ

Проаналізовано генетичну структуру популяцій рамчастого коропа любінського внутрішньопорідного типу, помісного рамчастого коропа, лускатих і рамчастих коропів несвицького зонального типу, амурських сазанів та їх гібридів з коропом за 4-ма генетико-біохімічними системами крові. Виявлено специфічні особливості будови генетичної структури за дослідженими локусами.

У коропівництві селекційно-племінна справа охоплює питання закріплення генетичного потенціалу існуючих порід та внутрішньопорідних типів українських коропів, збереження генофонду рідкісних і малопоширених масивів коропа, формування гетерогенного племінного матеріалу амурського сазана для потреб промислової гібридизації, створення нових типів високоспинних малолускатих коропів з поліпшеними господарськими характеристиками, втім числі з використанням генетичних ресурсів зарубіжної селекції. Тому необхідно: вивчити генетичну структуру наявного племінного матеріалу коропа різного генезису, проводити стабілізацію основних показників

продуктивності, виділити нові більш продуктивні господарсько-цінні генотипи, сформувати та впровадити у виробництво високопродуктивні стада [1].

На даний час необхідно створити всі умови для збереження генетичної чистоти вітчизняного генофонду українських порід коропа. У зв'язку з цим особливої актуальності набувають методи генетичного контролю популяцій за використанням молекулярно-генетичних маркерів, найбільш доступними з яких є вивчення біохімічного поліморфізму, який дає змогу контролювати селекційний процес, використовувати його при формуванні стада, враховуючи при цьому фактори штучного та природного добору [2].