СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Ribogospod. nauka Ukr., 2017; 3(41): 76-82
DOI: https://doi.org/10.15407/fsu2017.03.076
УДК 575.22:597.442

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ПОПУЛЯЦІЇ ГАЛИЦЬКОГО КОРОПА ГОСПОДАРСТВА «ВЕЛИКИЙ ЛЮБІНЬ» ЗА ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ

І. С. Ярова, ya.i.s92@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
О. В. Залоїло, ozaloilo@yahoo.com, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
В. В. Бех, vitbekh@online.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
І. А. Залоїло, zaloilo@yahoo.com, Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Мета. *Дослідити генетичну структуру популяції галицького коропа з використанням мікросателітних ДНК-маркерів.*

Методика. *Зразки крові відібрані з хвостової вени особин галицького коропа господарства «Великий Любінь», Львівська обл. (n=15 екз.), які були мічені електронними чипами марки Aqua Ритр та A-CHIP. Загальна ДНК була виділена за стандартною методикою, за допомогою набору Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (США). Концентрацію та якість ДНК визначали на біофотометрі Eppendorf Bio Photometr.*

Для дослідження генетичної структури популяції коропа використовували чотири мікросателітні маркери: MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31.

Результати*. Як матеріал для досліджень використовували зразки крові, відібрані з хвостової вени риб (n=15 екз.). У ході роботи підібрано оптимальні умови проведення SSR-PCR — аналізу. Проведені дослідження дозволили визначити чинники, які мають найбільший вплив на ефективність ампліфікації, а саме: концентрація препарату ДНК, концентрація праймера у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації. У досліджуваній групі за чотирма мікросателітними локусами було виявлено 18 алелей з молекулярною масою 130–343 п.н. Число алелей на локус варіювало від 3 до 6. Найбільш поліморфним був локус MFW 23 (виявлено 6 алелей), а найменш поліморфним — локус MFW 31 (виявлено 3 алелі). Ефективне число алелей у досліджуваній вибірці генотипів варіювало від 2,14 (MFW 31) до 5,23 (MFW 23). За розрахунками алельних частот визначено основні показники генетичної мінливості. Максимальний рівень наявної гетерозиготності зафіксований для локусу MFW 23, найнижчий — для локусу MFW 31.*

Наукова новизна*. Вперше було досліджено генетичну структуру популяції галицького коропа.*

Практична значимість*. Результати будуть використовуватися у подальших дослідженнях масиву галицького коропа.*

Ключові слова: *галицький короп, мікросателітні локуси, популяція, ДНК.*

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Короп (*Cyprinus carpio*) — один з основних об'єктів ставового рибництва на території пострадянського простору та країн Східної Європи. Завдяки високій

© І. С. Ярова, О. В. Залоїло, В. В. Бех, І. А. Залоїло, 2017

плодючості та порівняно простим умовам утримання, коропи здавна використовувалися для селекції, у результаті чого з'явився ряд порід з унікальними морфометричними особливостями та високими смаковими якостями [1, 2].

Галицький короп є однією з найдавніших порід коропа, характеризується високоспинністю. Він малопоширений в межах України, що зумовлює необхідність більш широко займатися дослідженнями даного виду коропа. Він потребує детального вивчення щодо його зимостійкості, рибогосподарського використання, ведення селекційної роботи з ним в умовах господарств Прикарпаття. Отже, галицький короп є перспективною породою як для промислового вирощування, так і для ефективного ведення селекційної роботи [3].

Таким чином, доцільним було провести основні генетичні дослідження для чіткого подальшого аналізу та порівняння результатів.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Утримання породи в окремому господарстві може істотно ускладнюватися внаслідок генетичних змін. Результатом численних спаровувань особин у межах однієї популяції є втрата товарних характеристик риб, зниження репродуктивних якостей, зменшення стійкості до захворювань, уповільнення росту, поява мутацій тощо. Тому проведення генетичних досліджень популяцій галицького коропа у сучасних рибницьких господарствах набуває пріоритетної актуальності.

Ефективним методом у даному аспекті може стати використання мікросателітних маркерів. 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 [4–7].

Метою роботи було дослідження генетичної структури популяції галицького коропа з використанням мікросателітних ДНК-маркерів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Як матеріал для досліджень використовували зразки крові, відібрані з хвостової вени особин галицького коропа господарства «Великий Любінь», Львівська обл. (n=15 екз.), які були мічені електронними чипами марки Aqua Pump и A-CHIP. Загальна ДНК була виділена за стандартною методикою, за допомогою набору Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (США). Концентрацію та якість ДНК визначали на біофотометрі Eppendorf Bio Photometr.

Для дослідження генетичної структури популяції коропа використовували чотири мікросателітні маркери: MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31 [8].

Таблиця 1. **Нуклеотидні послідовності праймерів**

Локус	Послідовність праймерів 5'-3'	Температура відпалу праймерів (°С)
MFW 15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R: GTTCACAAGGTCATTTCCAGC	54
MFW31	F:CCTTCCTCTGGCCATTTCCAC R:TACATCGCAGAGAATTCGTAAG	53
MFW 23	F:GTATAATTGGGAGTTTTAGGG R:CAGGTTTATCTCCCTTCTAG	55
MFW06	F: ACCTGATCAATCCCTGGCTC R:TTGGGACTTTTAAATCACGTTG	55

ПЛР проводили на ампліфікаторі «Termo scientific» (Arktik Termal Cycler) в наступному температурному режимі: 5 хв за 94°С; 33 цикли: 1 хв за 94°С, 30 с за 53–55°С (в залежності від локуса), 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 (NH_4) $2SO_4$, 0,01% Tween-20, 0,2 ммоль dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 50 нг ДНК, 1,7 ммоль $MgCl_2$ і по 0,2 мкм праймерів. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації здійснювали в 3%-му агарозному гелі з використанням 1×TAE-буфера.

Опрацювання і аналіз гелів проводили за допомогою програми Totallab v2.01. Статистичне опрацювання отриманих результатів виконували з використанням комп'ютерної програми Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Були проаналізовані генотипи особин з використанням чотирьох мікросателітних локусів ДНК: MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31. У ході роботи підібрано оптимальні умови проведення SSR-PCR аналізу. Проведені дослідження дозволили визначити чинники, які мають найбільший вплив на ефективність ампліфікації, а саме: концентрація препарату ДНК, концентрація праймера у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації. Для отримання чітких і відтворюваних алелей по кожному локусу було індивідуально підібрано оптимальні умови проведення ПЛР. Приклади отриманих SSR-спектрів наведені на рис. 1.

У дослідженій групі генотипів за чотирма мікросателітними локусами MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31 було виявлено всього 18 алелей з молекулярною масою 130–343 п.н. Число алелей на локус варіювало від 3 до 6. Найбільш поліморфним був локус MFW 23 (виявлено 6 алелей), а найменш поліморфним — локус MFW 31 (виявлено 3 алелі; табл. 2).

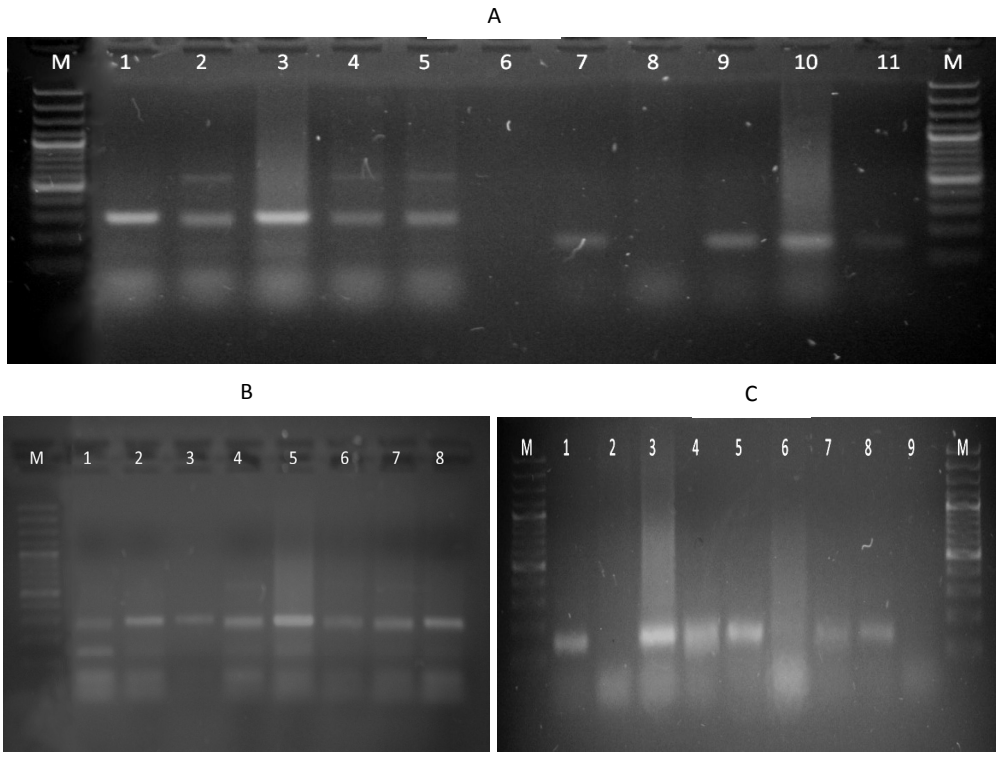

Рис. 1. **Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації SSR-PCR за локусами MFW 15 і MFW 31 (A), MFW 23 (B), MFW 06 (C) (1–11 — досліджені зразки, M — маркер молекулярної маси)**

Таблиця 2. **Характеристики мікросателітних локусів ДНК**

Локус	Кількість алелей	Молекулярна маса продукту (п.н.)	Ефективне число алелей	H_{obs}	H_{exp}
MFW 06	4	149–162	3,333	0,600	0,700
MFW 15	5	141–343	3,937	0,650	0,746
MFW 23	6	130–168	5,236	0,850	0,809
MFW 31	3	258–307	2,146	0,500	0,534
Середнє	4,5	237	3,663	0,65	0,697

Ефективне число алелей (показник, який характеризує локуси за частотою трапляння алелей) у досліджуваній вибірці генотипів варіювало від 2,14 (MFW 31) до 5,23 (MFW 23). Середнє ефективне число алелей на локус склало 3,663. За розрахунками алельних частот визначено основні показники генетичної мінливості. Максимальний рівень наявної гетерозиготності зафіксований для локусу MFW 23, найнижчий — для локусу MFW 31. Значення фактичної гетерозиготності за мікросателітним локусом MFW 31 було близьким до очікуваного, локус MFW 23 характеризувався надлишком гетерозигот, а для локусів MFW 06 і MFW 15 визначено їх дефіцит.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Досліджено генетичну структуру популяції галицького коропа господарства «Великий Любінь» з використанням мікросателітних ДНК-маркерів.

За кожним локусом індивідуально підібрано оптимальні умови проведення ПЛР та розраховано їх основні характеристики (ефективне число алелей та показники гетерозиготності).

Запропонований у роботі метод мікросателітного аналізу буде ефективним для дослідження сформованої популяції галицького коропа та її подальшого генетичного контролю. Описаний спосіб дослідження поліморфізму є доцільним для використання у селекційній роботі з цією популяцією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Катасонов В. Я., Гомельський Б. И. Селекция рыб з основами генетики. М. : Агропромиздат, 1991. 208 с.
2. Кузема А. И. Разведение и селекция карпа : научный отчет НИИ рыбного хозяйства Украины. Киев, 1936. 188 с.
3. Кузема А. И. Создание исходных селекционных стад карпа в рыбхозах Киевского и Винницкого рыбтрестов, их характеристика и оценка : научный отчет НИИ рыбного хозяйства. Киев, 1948. 121 с.
4. Тарасюк С. І., Грициняк І. І. Молекулярно-генетичні дослідження в рибництві. Київ : Аграрна наука, 2013. 310 с.
5. Дубін О. В. Мікросателітні маркери у дослідженні генетичного поліморфізму російського осетра. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2012. Вип. 4, т. 2, ч. 1. С. 70—73.
6. Characterization of microsatelllite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and cross-amplification in other cyprinid species / Gheyas A. A. et al. *// Molecular Ecology Notes*. 2006. № 3. P. 455—461.
7. Ровба Е. А., Конєва О. Ю., Дромашко С. Е. Оценка генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции с помощью микросателитных маркеров // Актуальные проблемы выращивания и переработки прудовой рыбы : Междунар. науч.-техн. интернет-конф. : матер. Краснодар : Кубанский государственный технологический университет, 2012. С. 22—23.
8. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / Crooijmans R. et al. *Animal Genetics.* 1997. Vol. 28. P. 129—134.

REFERENCES

1. Katasonov, V. Ya., & Gomel'skiy B. I. (1991). *Selektsiya ryb s osnovami genetiki.* Moskva : Agropromizdat.
2. Kuzema, A. I. (1936). Razvedenie i selektsiya karpa : *nauchnyy otchet NII rybnogo khozyaystva Ukrainy.* Kiev.
3. Kuzema A. I. (1948). Sozdanie iskhodnykh selektsionnykh stad karpa v rybkhozakh Kievskogo i Vinnitskogo rybtrestov, ikh kharakteristika i otsenka : nauchnyy otchet NII prudovogo i ozernogo rybnogo khozyaystva MRP USSR. Kiev.
4. Tarasyuk, S. I., & Hrytsyniak, I. I. (2013). *Molekuliarno-henetychni doslidzhennia v rybnytstvi*. Kyiv : Agrarna nauka.

5. Dubin, O. V. (2012). Mikrosatelitni markery u doslidzhenni henetychnoho polimorfizmu rosiiskoho osetra. *Visnyk ahrarnoi nauky Prychornomoria, 4, 2, 1,* 70-73.
6. Gheyas, A. A., Cairney, M., Gilmour, A. E., Sattar, M. A., Das, T. K., Mcandrew, B. J., Penman, D. J., & Taggart, J. B. (2006). Characterization of microsatelllite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and cross-amplification in other cyprinid species. *Molecular Ecology Notes, 3,* 455-461.
7. Rovba, E. A., Koneva, O. Yu., & Dromashko, S. E. (2012). Otsenka geneticheskogo raznoobraziya porod karpa belorusskoy selektsii s pomoshch'yu mikrosatellitnykh markerov. *Aktual'nye problemy vyrashchivaniya i pererabotki prudovoy ryby: Mezhdunar. nauch.-tekhn. internet-konf.: mater*. Krasnodar: Kubanskiy gosudarstvennyy tekhnologicheskiy universitet, 22-23.
8. Crooijmans, R. P. M. A., Poel, J. J. V. D., Groenen, M. A. M., Bierbooms, V. A. F., & Komen, J. (1997). Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Animal Genetics, 28,* 129-134.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИИ ГАЛИЦИЙСКОГО КАРПА ХОЗЯЙСТВА «ВЕЛИКИЙ ЛЮБЕНЬ» ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

И. С. Яровая, ya.i.s92@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
О. В. Залоило, ozaloilo@yahoo.com, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
В. В. Бех, vitbekh@online.ua, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
И. А. Залоило, zaloilo@yahoo.com, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

***Цель**. Исследовать генетическую структуру популяции галицийского карпа с использованием микросателлитных ДНК-маркеров.*

***Методика.** Образцы крови отобраны из хвостовой вены особей галицийского карпа хозяйства «Великий Любень», Львовская обл. (n = 15 экз.), которые были помечены электронными чипами марки Aqua Pump и A-CHIP. Общая ДНК была выделена по стандартной методике, с помощью набора Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (США). Концентрацию и качество ДНК определяли на биофотометре Eppendorf Bio Photometr.*

Для исследования генетической структуры популяции карпа использовали четыре микросателлитных маркера: MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31.

***Результаты**. В качестве материала для исследований использовали образцы крови, взятые из хвостовой вены рыб (n = 15 экз.). В ходе работы подобраны оптимальные условия проведения SSR-PCR — анализа. Проведенные исследования позволили определить факторы, оказывающие наибольшее влияние на эффективность амплификации, а именно: концентрация ДНК, концентрация праймера в реакционной смеси и количество циклов амплификации. В исследованной группе по четырем микросателлитным локусам было выявлено 18 аллелей с молекулярной массой 130–343 п.н. Число аллелей на локус варьировало от 3 до 6. Наиболее полиморфным был локус MFW 23 (выявлено 6 аллелей), а наименее полиморфным — локус MFW 31 (выявлено 3 аллеля). Эффективное число аллелей в исследуемой выборке генотипов варьировало от 2,14 (MFW 31) до 5,23 (MFW 23). По расчетам аллельных частот определены основные показатели генетической изменчивости. Максимальный уровень имеющейся гетерозиготности зафиксирован для локуса MFW 23, наиболее низкий – для локуса MFW 31.*

***Научная новизна**. Впервые была исследована генетическая структура популяции галицийского карпа.*

***Практическая значимость**. Результаты будут использоваться в дальнейших исследованиях массива галицийского карпа.*

***Ключевые слова:** галицийский карп, микросателлитные локусы, популяция, ДНК.*

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF GALICIAN CARP POPULATION ON THE BASE OF FISH FARM «VELYKYY LYUBIN´» WITH USING MICROSATELLITE MARKERS

I. S. Yarova, ya.i.s92@ukr.net, Institute of Fisheries of the NAAS of Ukraine, Kyiv
O. V. Zaloilo, ozaloilo@yahoo.com, Institute of Fisheries of the NAAS of Ukraine, Kyiv
V. V. Bech, vitbekh@online.ua, Institute of Fisheries of the NAAS of Ukraine, Kyiv
I. A. Zaloilo, zaloilo@yahoo.com, National University of life and environmental sciences of Ukraine, Kyiv

***Purpose**. To investigate the genetic structure of the Galician carp population using microsatellite DNA markers.*

***Methodology**. Blood samples taken from the caudal vein of the specimens of the Galician carp farm "Velykyy Lyubin", Lviv region. (N = 15 persons). When landing, they were labeled with electronic chips of the brand Aqua Pump and A-CHIP. The total DNA was isolated using the standard method, using the Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (USA). The concentration and quality of DNA were determined on an Eppendorf Bio Photometr biophotometer.*

To study the genetic structure of the Galician carp population, four microsatellite markers were used: MFW 06, MFW 15, MFW 23, MFW 31.

***Findings**. Blood samples taken from the tail vein of fish (n = 15 oz.) Were used as research material. In the course of work, optimal conditions for SSR-PCR analysis have been selected. The conducted studies allowed to determine the factors that have the greatest impact on the amplification efficiency, namely: the concentration of the DNA preparation, the concentration of the primer in the reaction mixture and the number of amplification cycles. In the study group, for all 4 microsatellite loci, only 18 alleles with a molecular weight of 130-343 ng were detected. The number of alleles per locus varied from 3 to 6. The most polymorphous was the locus MFW 23 (6 alleles were detected), and the least polymorphic was the locus MFW 31 (3 alleles were detected). The effective number of alleles in the sample of genotypes studied varied from 2.14 (MFW 31) to 5.23 (MFW 23). According to calculations of allelic frequencies, the main indicators of genetic variability are determined. The maximum level of available heterozygosity is fixed for the MFW 23 locus, the lowest for the MFW locus 31.*

***Originality**. For the first time in 65 years the genetic structure of the Galician carp population has been investigated.*

***Practical value**. The results will be used in further studies of the arboreal of Galician carp.*

***Keywords.** Calician carp, microsatellite loci, population, DNA.*