

УДК 575.22; 639.3.03:639.371.5

АКТУАЛЬНІСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В АКВАКУЛЬТУРІ

С.І. ТАРАСЮК¹, О. Ю. БЕЛКОВА², С.О. КОЛІСНИК¹

¹Інституту рибного господарства НААН, м. Київ

²Національний авіаційний університет, м. Київ

В представленій статті розглянуто стан та перспективи сучасних молекулярно-генетичних досліджень в аквакультурі, короткий огляд способів вивчення генетичної структури за використання різних типів маркерів.

В результаті використання молекулярно-генетичних маркерів можна оцінити внутрішньовидовий генетичний поліморфізм, здійснити паспортизацію ремонтно-маточних стад та подальше формування батьківських пар плідників за альтернативними генотипами з метою підвищення якості генетичного матеріалу племінних ресурсів риб для контролю ефективності відтворення в умовах вітчизняних рибницьких господарств.

Ключові слова: молекулярні маркери, молекулярно-генетичний поліморфізм, генотип, генетична структура, молекулярно-біохімічні методи, аквакультура.

Для з'ясування популяційної структури будь-якого виду потрібний глибокий і всебічний аналіз, який включає використання генетичних, фізіолого-біохімічних, морфологічних, екологічних та інших підходів і методів дослідження, екстрапольованих на весь простір видового ареалу. Це особливо важливо у застосуванні до видів, які є об'єктами господарської діяльності, популяція яких, до того ж, розглядається не тільки як елементарна еволюційна одиниця, але й як самостійна одиниця продукції.

Популяційні дослідження, що мають за мету вивчення генетичної структури та динаміки природних популяцій, процесів, зв'язок їх із подіями на інших рівнях, за правило розглядаються в якості пріоритетних для сучасних досліджень, дійсно допомагаючи вирішувати багато важливих і актуальних теоретичних і практичних проблем [1].

Генетичні маркери виявилися незамінним інструментом для виявлення діапазону популяційної і видової мінливості, вивчення філогенезу, ступеню генетичної подібності та мікроеволюції порід тварин. Дані ФАО за оцінкою наявності порід сільськогосподарських видів тварин свідчать, що завдання раціонального використання й збереження генетичних ресурсів, проведення систематичного генетичного моніторингу є також актуальним і у рибництві [2].

На даний час у світі склалась ситуація, коли традиційні підходи до вивчення рибогосподарських об'єктів вже не відповідають сучасним вимогам. Наукові основи моніторингу біорізноманіття і організація раціонального ведення господарювання потребують отримання кількісних оцінок популяційно-генетичних параметрів, що є можливим лише на основі молекулярно-генетичних маркерів, які залишаються одним із важливих інструментів вивчення популяційно-генетичної структури, внутрішньо- і міжвидової диференціації і гібридизації об'єктів рибництва [3–4]. Незважаючи на швидкий розвиток методів аналізу ДНК, ізоферменти залишаються досить корисними генетичними маркерами, оскільки за їхньої допомоги можна отримати генетичну інформацію про стан генофондів природних та штучних популяцій риб за короткий час і приспорівняно невеликих затратах матеріальних ресурсів. Разом з тим, неможна не звернути увагу на той факт, що при дослідженні генетико-біохімічного поліморфізму в кожній із досліджуваних популяцій окрім поліморфних локусів, за тих самих методичних умов, завжди виявляються і мономорфні локуси [4–5].

Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму, як структурних генів, так і окремих анонімних локусів ДНК у різних видів тварин необхідне для вирішення питань накопичення в популяціях тварин гетерозиготності та

змінення консолідації окремих груп або порід [3]. Ці маркери дають можливість проведення моніторингу при селекційній роботі з новими типами та лініями. Вивчення генетичної структури порід та породних груп різних видів, в тому числі і риб дозволяє виявляти породо- і екологоспецифічні характеристики генофондів [6–7] і досліджувати механізми їх утворення, особливості дрейфу генів від предкового генофонду до існуючої конкретної породи, впливу на нього екологічних умов її відтворення [4, 8].

Однією з важливих проблем підвищення ефективності вдосконалення порід та породних груп є вивчення генетичних детермінант формування продуктивності й використання генетичного моніторингу при керуванні селекційним процесом. Багатовікова практика розведення розробила різні методи створення й поліпшення порід, суть яких зводиться до виявлення й інтенсивного використання тварин із бажаними ознаками [9]. Такий підхід досить довго забезпечував ефективність селекційного процесу і багато селекційних програм по вдосконаленню порід, типів і ліній тварин, розроблених на даній основі. Проте стає все більш очевидним, що одні лише традиційні методи розведення не можуть забезпечити помітного селекційного прогресу в породах, окрім того, гостро постає питання про зниження відтворних властивостей, життєздатності й стійкості до захворювань [5].

Селекціонерам добре відомо, що чим вища продуктивність тварин, тим складніше досягти селекційних зрушень [10–11]. Це відбувається тому, що інтенсивна селекція призводить, з одного боку, до підвищення продуктивності, з іншого боку – до зниження генетичного розмаїття й нагромадження генетичного вантажу. Зменшення резерву генетичної мінливості може призвести до втрати адаптивних якостей тварин і неефективної роботи в селекції.

Сучасні генетичні підходи до вдосконалення порід засновані на більш повній оцінці генотипу тварин і генетичної різноманітності популяцій за допомогою маркерних технологій, таких як маркер-допоміжна селекція, контроль походження й інтрогресія (міжвидовий перенос генів) [1–2, 12].

Відомо, що на перших етапах у створенні породи або породної групи, як правило, бере участь обмежена кількість тварин, генотипи яких у значній мірі визначають генофонд породи в цілому. Збереженню і підтриманню стабільної генетичної структури риб багато в чому сприяє чистопородне розведення, при цьому періодичне прилиття крові є цілком достатньою умовою для підтримки внутрішньопородної генетичної подібності популяції. Вивчення алельних частот маркерних генів дозволяє визначити генетичні відмінності й ступінь генетичної подібності порід та породних груп риб, на які впливають не тільки час роздільної еволюції, але й напрямок добору [13]. Можна очікувати, що відмінності в генетичній структурі особин, що схрещуються, будуть сприяти одержанню ефекту гетерозису. Вивчення генетичних особливостей новостворених та природних популяцій риб є основою для розробки методів генетичного моніторингу. Перспективність використання поліморфних генетико-біохімічних систем та нуклеотидних повторів ДНК для маркування генотипів дозволить контролювати процес передачі генів батьківських пар нащадкам у ряді поколінь, визначати фактичний індекс генетичної подібності та прогнозувати ефективність підбору й добору [14–16].

Молекулярно-генетичні маркери

Необхідною передумовою для використання генетичних маркерів є генетичний поліморфізм, який лежить в основі спадкової мінливості всіх ознак організму. Говорячи про генетичний поліморфізм, потрібно зважати на конкретний локус, який представлений щонайменше двома формами прояву – алелями [17]. Генетичний поліморфізм може бути виявлений на фенотиповому, біохімічному, хромосомному, молекулярному і генному рівнях. У разі молекулярно-генетичного поліморфізму йдеться про зміни в структурі ДНК, що зумовлені різними типами мутацій: поодинокими нуклеотидними замінами, делеціями і інсерціями від меншого до більшого числа нуклеотидів [1; 18].

Генетичний поліморфізм, який виявляється за допомогою молекулярно-генетичних маркерів (МГМ), є центральною ланкою в сучасному генетичному аналізі. Як правило, всередині кожного типу МГМ окремі локуси суттєво

відрізняються один від одного за поліморфізмом, складністю й відтворюваністю їх виявлення. Використовувані маркери повинні мати певні властивості і відповідати ряду вимог, це:

- 1) доступність фенотипових проявів алельних варіантів для ідентифікації у різних особин;
- 2) відмінності алельних замін в одному локусі від таких в інших локусах;
- 3) доступність частини алельних замін в кожному локусі, що вивчається, для ідентифікації;
- 4) локуси, що вивчаються, повинні представляти випадкову вибірку генів відносно їх фізіологічних ефектів і ступеню мінливості;
- 5) рівномірність по локалізації за розподілом в геномі;
- 6) повинні легко виявлятися, відтворюватись і бути дешевими;
- 7) можливість автоматизації виявлення;
- 8) відносна нейтральність.

Очевидно, що не існує такого стандартного набору маркерів, який відповідав би всім цим вимогам. Найбільш використовувані МГМ умовно можна підрозділити на наступні типи:

- маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти білків);
- маркери некодуючих ділянок структурних генів;
- маркери різних послідовностей ДНК, відношення якої до структурних генів, як правило, невідоме – розподіл коротких повторів по геному (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA – випадково ампліфікована поліморфна ДНК; ISSR – інвертовані повтори; AFLP – поліморфізм в сайтах рестрикції) і мікросателітні локуси (тандемні повтори з довжиною в 2–6 нуклеотидів) [7].

Молекулярні маркери є надзвичайно важливим у вивченні природи локусів кількісних ознак (QTL), картування генів, а також у розробці методів перенесення коадаптованих генів в інші форми. Проте практичне застосування молекулярних маркерів для створення нових високопродуктивних і екологічно пластичних порід і породних груп сільськогосподарських видів поки що дуже

відстає від потенційних можливостей зазначених методів. Цей розрив пов'язаний з відносно високими первинними витратами на устаткування молекулярно-генетичних лабораторій і недостатньою технологізацією методів, більшість з яких надійні лише в руках висококваліфікованих фахівців. Важливим фактором став і певний консерватизм потенційних споживачів результатів маркерного аналізу – селекціонерів. У міру спрощення і автоматизації багатьох методів молекулярно-генетичного аналізу зникають технічні перешкоди на шляху впровадження молекулярних маркерів в практику селекції і розведення, проте потрібно набагато більше часу, щоб подолати недовіру тих, хто в майбутньому більше всіх виграє від практичного використання цих методів.

Перевага класичних методів аналізу фенотипової різноманітності полягає в тому, що вони засновані на прямій оцінці ознак, важливих для селекціонера[20]. Їх складно поліпшити або замінити експрес-методами. Проте більшість господарсько-цінних ознак залишаються недостатньо дослідженими відносно генів, що детермінують їх розвиток. Для цієї мети широко використовуються методи молекулярної генетики [1,5, 11].

Давно вживані морфологічні і біохімічні маркери вказують на особливості форми, забарвлення або біохімічний склад тварин. Число подібних маркерів невелике, до того ж полігенна природа багатьох фенотипових ознак обмежує можливості генетичного картування господарсько важливих генів і контролю за перенесенням цих генів в нові форми. Використання білкових молекул (ізоферменти, запасні білки і т.п.) як фенотипових маркерів – продуктів індивідуальних генів – істотно розширює можливості картування генів і їх моніторингу в селекційному процесі і дозволило створити нові методи ідентифікації і систематизації порід тварин [6; 19].

Генетико-біохімічні маркери

На відміну від теплокровних домашніх тварин, розведення риб досить специфічне, що обумовлено їх видовою різноманітністю, яка поєднується з виключно високою значимістю абіотичних, біотичних і антропогенних

факторів. На жаль, об'єктивна реальність свідчить про те, що інтенсивність впливу антропогенних факторів зберігає тенденцію до підвищення, що обумовлено нарощенням господарської діяльності людини. Змінюються гідрологічний режим, фізико-хімічні показники континентальних і морських вод, що негативно впливає на видовий склад, чисельність і біомасу гідробіонтів, зокрема риби. Зважаючи на специфічність особливостей розмноження кожного виду, необхідно розглядати цей процес в адаптаційному плані. Специфічність або видоспецифічні особливості цього процесу не що інше, як пристосування до певних умов розмноження і розвитку молоді, що забезпечують циклічність поповнення, що необхідно для збереження виду і підтримання чисельності його популяцій в ареалі [4–5].

Ізоферменти як генотипові маркери відіграють важливу роль в контролі перенесення генетичного матеріалу. Будь-які маніпуляції з генетичним матеріалом, починаючи від злиття протопластів у рослин і до перенесення окремих геномів і хромосом, потребують контролю ефективності інтродукції генетичного матеріалу, для чого з високою ефективністю застосовуються різні ізоферменти [21–22].

Білкові маркери дають принципово нові можливості для ідентифікації генотипів за багатьма генами і вивчення динамічних змін частот алелів в процесі селекції та дозволяють контролювати племінну роботу. Спроби прискорити селекційний процес включенням в роботу простих біохімічних ознак тварин, так як і простих генетичних систем, які пов'язані із складними ознаками продуктивності, беруть свій початок ще з робіт М. Кольцова. Перша спроба дати теоретичне обґрунтування ефективності використання генетичних маркерів в генетиці і селекції зроблена О. Серебровським в роботі «Генетичний аналіз» [23].

Генетичні маркери також можуть бути використані для оцінки результатів родинного розведення й контролю за рівнем гомозиготності в інбредних особин[25]. Контроль за рівнем гомозиготності й поліморфності особливо важливий при розведенні малочисельних локальних порід та породних груп

риб. Перевага методів біохімічної генетики виявляється особливо при селекції ставових риб. Це питання детально висвітлено окремими авторами [4, 6]. Дослідники вказують, що ставові риби відрізняються від інших домашніх тварин великою плодючістю і деякими особливостями розмноження, внаслідок чого у молодому віці їх нащадки не можуть бути індивідуально ідентифіковані і помічені. Тому саме застосування білкових генетичних маркерів відкриває можливості для генетичного аналізу продукційних ознак шляхом конструкції комплексних сімейних структур (діалельні схрещування, напівсибси і сибси), контролю чистоти лінії [4–5].

Роботи з біохімічної генетики риб мають важливе практичне значення. Вони необхідні для розроблення методів охорони і відтворення запасів промислових риб – як морських, так і прісноводних. В селекційній практиці алелі білкових локусів використовуються для маркування порід і племінних груп риб, для аналізу інбридингу та інших процесів, які відбуваються в популяціях одомашнених видів риб, для швидкого накопичення даних з приватної генетики об'єктів селекції. Важливими є дослідження з біохімічної генетики коропа, з метою аналізу генетичної структури популяцій, з проблем регуляції дії генів в онтогенезі і по виявленню природи біохімічного поліморфізму [26].

Використання ізоферментів як генетичних маркерів набуває особливої важливості у зв'язку з необхідністю контролю генетичних процесів при створенні складних, багатокomпонентних синтетичних порід тварин [20]. Створення генофондів порід включає цілий ряд етапів, на кожному з яких необхідне використання генетичних маркерів, починаючи з оцінки генетичної мінливості батьківських форм, змін генних частот в кожному поколінні до оцінки генетичної різноманітності кінцевих форм і оцінки ступеню їх консолідації.

Генетика ізоферментів дає можливість проводити пошук закономірностей функціонування генів в онтогенезі, вивчати роль ізоферментів при проходженні морфогенетичних процесів, клітинній диференціації, при тому

виявляються генетичні механізми регуляції експресії спектру ізоферментів і рівень їх використання, аналізується роль ізоферментів в регуляції процесів метаболізму. Як приклад такого аналізу, можна привести результати вивчення ізоферментів лактатдегідрогенази. Проведені дослідження показали певну послідовність активації генів в ембріогенезі, відмінність їх експресії в спеціалізованих тканинах і органах [27].

Наявність внутрішньовидової мінливості дозволяє проводити генетичний аналіз популяцій. Об'єднання його з принципами і методами класичної генетики дає можливість локалізувати відповідні гени в рамках груп зчеплення і характеризувати особливості їх взаємодії. Еволюційне зіставлення локалізації гомологічних генів дає необхідну інформацію про міжвидову і міжродинну дивергенцію гомологічних ділянок хромосом [28].

В якості маркерів використовують алелі різних поліморфних білків, в тому числі і неспецифічних естераз сироватки крові та м'язової тканини риб. Різні білки у риб відрізняються різним рівнем мінливості.

Цікавими і перспективними напрямками застосування даних про мінливість ізоферментів і інших поліморфних білків є: оцінка внутрішньо- і міжвидової генетичної мінливості [24], виявлення зв'язків філогенезу між різними таксономічними групами, оцінка кількості генетичних змін при видоутворенні, дослідження генетичних основ мікроеволюційних процесів, виявлення розмаху і механізмів підтримки генетичної мінливості.

Чисельні дослідження поліморфізму білків, ферментів і систем крові у нас в країні [29] і за кордоном доказали існування вираженої внутрішньовидової різноманітності за цілим рядом локусів структурних генів (*Alb*, *Ca*, *Cr*, *Est*, *6-PGD*, *Tf*). Більш низький рівень поліморфності був відзначений у локусах ферментів – кислої фосфатази (*AP*), НАДФ-діафори (DIA), глюкозофосфатізомерази (*GPI*) і фосфоглюкомутази (*PGM*). Найвищий рівень поліморфності досліджених локусів було відзначено у нативних популяцій, які добре пристосовані до існування в природних умовах. Білковий поліморфізм дуже зручний для вивчення і контролю генетичної диференціації груп тварин у

зв'язку з їх відтворенням в різних еколого-географічних умовах. Біохімічні маркери є своєрідною зв'язуючою ланкою між власне генетичними і фенотиповими рівнями мінливості [20]. Дослідження проводилися та ведуться в найрізноманітніших і різнопланових напрямках – вивчається онтогенез, зчеплення і хромосомна локалізація генів, тканинна і внутрішньоклітинна специфічність їх експресії, роль взаємодії алельних і неалельних генів, вплив на генетичну структуру популяції різних форм відбору [5].

На даний час використання морфологічних моногенно успадкованих ознак не є достатнім для вирішення практичних завдань селекції, генетики, розведення та збереження риб перш за все через їх невелику кількість та низьке алельне різноманіття. На сьогоднішній день при вирішенні різноманітних, в залежності від мети, завдань в різних галузях тваринництва, зокрема рибництві, на перший план виходить відбір ознак, які контролюються, як окремими генами так і їх комплексами, які відносно легко ідентифікуються за допомогою даних молекулярно-генетичних аналізу.

ДНК-маркери

За останні роки накопичився великий масив даних про ефективність використання молекулярно-генетичних маркерів, як на рівні білків, ДНК так іРНК, для вирішення багатьох завдань генетики, селекції, збереження біорізноманіття, вивчення механізмів еволюції, картування хромосом, а також для практичного використання в тваринництві, в тому числі і рибництві [1, 5].

Є цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні: аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК; аналіз поліморфізму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інші методи на основі ампліфікації ДНК між повторюваними послідовностями в геномній ДНК (IRAP, REMAP і іPBS) [5, 30–33].

До переваг ДНК-маркерів належать: високий рівень поліморфізму, множинність алелів, відсутність обмежень в аналізі, як кодуючих так і некодуючих послідовностей ДНК, висока точність і відтворюваність.

В сучасних умовах розвитку науки, більшість лабораторій переходить на використання технологій на основі ПЛР [12, 34–35]. Методи, які використовуються для опису генетичної мінливості на основі поліморфізму мітохондріальної та ядерної ДНК, є більш точними (дають можливість виявити точкові мутації), ніж вивчення поліморфізму генів, що кодують білки та ферменти. Число ДНК-маркерів у багато разів перевершує потенціал ізоферментів або білків. Крім того, прояв таких молекулярних маркерів часто буває нейтральний по відношенню до фенотипу, не тканинспецифічний і їх можна виявити на будь-якій стадії розвитку організму. Тому поява ДНК-маркерів радикально змінила методи оцінки генетичної різноманітності, паспортизації і класифікації порід, картування і визначення фізичної природи генів, інтрогресії нових генів і генетичного моніторингу в селекції та розведенні [5, 12, 37]. Різноманітні методи оцінки ДНК-поліморфізму в залежності від поставлених цілей успішно використовують на різних рівнях [11]. У багатьох випадках варіабельні ДНК-маркери дозволяють виявити генетичні відмінності, не розпізнані методами електрофорезу білків [36]. Слід наголосити також, що оцінка поліморфізму ДНК залежить від вибраного типу маркеру (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристики найбільш часто використовуваних типів ДНК-маркерів [5]

Тип маркеру	Лабораторне виконання	Надійність	Вартість досліджень
RFLP	Комплекс	Висока	Висока
RAPD	Простий	Низька	Низька
ISSR	Простий	Середня	Низька
SSR	Простий	Висока	Низька
AFLP	Комплекс	Висока	Висока
SCAR or STS	Простий	Висока	Низька
CAPS	Помірний	Висока	Середня
InDel	Простий	Висока	Низька

Поліморфізм ДНК може бути встановлений при прямому визначенні нуклеотидної послідовності в молекулі ДНК, але на практиці використовують методи, при яких, не вдаючись до визначення послідовності нуклеотидів виявляють з високою точністю відмінності у послідовності нуклеотидів, в ДНК між індивідуумами. При додаванні до зразку ДНК ендонуклеаз рестрикції з подальшим електрофоретичним розділенням отриманої суміші ДНК, одержують різні за довжиною фрагменти ДНК набір останніх при наявності поліморфізму ДНК між досліджуваними особинами буде відрізнятися. Даний метод визначення поліморфізму ДНК одержав назву – метод визначення довжини рестрикційних фрагментів ДНК (ПДРФ), або (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). Метод ПДРФ має широкий спектр свого застосування завдяки своїй простоті і надійності, однак він має деякі обмеження, а саме: нуклеотидні заміни мусять стосуватись сайтів рестрикції, при цьому вони можуть супроводжуватись як утворенням, так і навпаки усуненням останніх.

Інші методи визначення поліморфізму ДНК ґрунтуються на присутності в геномі коротких ділянок ДНК, які повторюються з високою частотою, так званих ДНК-маркерів [7, 12]. При проведенні ПЛР за використанням «випадкових» декануклеотидних праймерів, які можуть відпалюватись в декількох ділянках геному, отримують продукти ПЛР – різні за довжиною фрагменти ДНК, які франковані інвертованими послідовностями декануклеотидного праймеру. ПЛР, при якій використовують декануклеотидні праймери з випадковою послідовністю нуклеотидів, носить назву Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). RAPD є надійним і точним методом, який використовується для створення генетичних карт, ідентифікації генотипів, оцінки генетичного різноманіття в популяціях, встановлення генетичного взаємозв'язку між видами, породами та сортами. Оскільки специфічність ПЛР залежить головним чином від відповідності послідовності нуклеотидів праймерів первинній структурі ампліфікуючих фрагментів ДНК, то така специфічність наближається до абсолютної при збільшенні довжини

праймерів[19]. Основними недоліками RAPD є його чутливість до змін умов реакції та неможливість розрізнити гомозиготний та гетерозиготні стани RAPD-маркерів, що знижує точність оцінки при використанні їх у популяційних дослідженнях в порівнянні з кодомінантними маркерами [37].

Одним з методів, що дозволяють без визначення конкретної послідовності ДНК отримати індивідуальний для кожної особини електрофоретичний спектр, є Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). При цьому методі, як і при RAPD використовується один, або ж декілька праймерів довжиною 15–24 нуклеотидів [38], але в даному випадку праймери являють собою тандемно повторювані послідовності 2–4 нуклеотидів і однієї селективної основи на 3'-кінці праймеру. Продукт PCR ISSR – відрізок ДНК, фланкований інвертованими послідовностями праймера. При використанні даного методу зникає проблема «сильних» і «слабких» праймерів, оскільки послідовність основ праймера специфічна. Мультилокусні спектри ампліфікації, одержувані в ISSR-PCR, налічують 10-60 смуг, які розділяють в агарозному або поліакриламідному гелі[38]. Ампліфікуються як структурні, так і некодуючі ділянки геному [12]. Одержуваний спектр ампліконів має певні обмеження, пов'язані з умовами ампліфікації; зокрема, недоступними для аналізу є фрагменти занадто великої довжини (2,5–3 kb).

До основних характеристик ISSR належать: висока точність, збільшена відтворюваність в порівнянні до RAPD, однак, як і в інших вищенаведених методах, локалізація продуктів ампліфікації в геномі, так і їх функція залишаються невідомими.

ISSR-PCR є удосконаленим методом шляхом збільшення точності відпалу праймера при збільшенні його довжини і усунення у ньому «випадковості» у послідовності основ.

Аналіз унікальних послідовностей ДНК, за використання мікросателітних локусів, має ряд безперечних переваг. Перш за все, ISSR-PCR - відносно дешевий і простий експрес-метод, що не вимагає знання нуклеотидної послідовності геному, що важливо для дослідження генофондів маловивчених

видів, що дає можливість одночасно порівнювати десятки мікросателітних локусів, які включають багато генів. У зв'язку з цим поліморфізм послідовностей ДНК, які фланковані інвертованими повторами, використовують для визначення генетичної мінливості, структури, специфічних геномних характеристик різних видів риб, пошуку філогенетичних зв'язків між породами і внутріпородними групами, тощо.

Завдяки високому рівню поліморфізму ISSR-локусів отримуємо цінну інформацію про певні генетичні зміни в популяціях під дією природного і штучного відбору. Також за допомогою ISSR-PCR отримані геномні фінгерпринти ряду тварин, як ссавців, так і риб [5; 38].

Аналіз послідовностей ДНК (локусів), які фланковані інвертованими мікросателітними повторами в різних видів ссавців привертає до себе велику увагу, оскільки вивчення даного питання, можливо, дозволить зрозуміти механізми еволюції, динаміки дивергенції видів в часі. Невідоме функціональне значення мікросателітної ДНК. Багато досліджень вказують на їх не випадковий розподіл в кодуючих і некодуючих ділянках ДНК [12, 36]. Є припущення стосовно того, що мікросателітні послідовності можуть брати участь в формуванні просторової структури ДНК і впливати на процеси транскрипції, трансляції і рекомбінації [8].

Мікросателіти (STR, Short Tandem Repeats) – це поліморфні послідовності ДНК, що містять короткі послідовно розташовані повтори, які є зручними генетичними маркерами через відносно нескладну методику визначення, високого рівня поліморфізму і стабільного аутосомного кодомінантного успадкування. Мікросателітні локуси розподілені по консервативних, маломінливих регіонах ДНК геномів і можуть демонструвати високі рівні внутрішньовидового алельного поліморфізму. Унікальні послідовності ДНК, розташовані по краях фланкують повтори, котрі можуть бути використані для ідентифікації та подальшої характеристики геномних регіонів, оточуючих ці локуси [5].

Основними вимогами до мікросателітних локусів є: високий рівень поліморфізму, відповідний розмір аллеля, низька ступінь мутацій, «працездатність» праймерів в полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), відсутність нульового алеля і генетична незалежність від інших локусів.

Мікросателітні локуси, у класі риб, зустрічаються приблизно на кожні 10000 п.о., тоді як мінісателітні локуси – на кожні 1500000 п.о. Консервативність фланкуючих послідовностей, на базі яких розробляються STR-праймери, і схожість організації мікросателітів дозволяють використовувати одні й ті ж праймери та протоколи аналізу для близьких видів, що, безсумнівно, є перевагою методу [3]. Однак імовірність мутації в сайтах праймерів приводить до феномену неампліфікуючого «нуль-алеля», що може привести до фіксації помилкової гомозиготності за даним локусом.

Вибір маркерних систем, заснованих на виявленні мікросателітних повторів, є також доцільним для оцінки мінливості сільськогосподарських тварин, що виникає не тільки внаслідок мейотичних рекомбінацій, а і в результаті селекційного тиску, процесів породного становлення, природної адаптації, генетичного дрейфу.

Поліморфізм мікросателітних послідовностей може бути використаний для побудови філогенетичного дерева та оцінки генетичних відстаней між популяціями. На основі ДНК, виділеної з останків риб, що відноситься до вимерших можна визначити таксономічну приналежність виду, в даний час відсутніх в екосистемі, а також для визначення філогенетичних відстаней [1]. Мікросателітні послідовності дозволяють ідентифікувати продукти, отримані з різних видів цінних риб. Вони є ефективним методом для виявлення фальсифікацій і комерційного шахрайства. Ефективність контролю походження тварин при використанні 10-12 мікросателітів досягає 99,99 %, що дає надійну гарантію вирішення суперечливих питань, пов'язаних із походженням [5].

З огляду на недостатність генетичних досліджень в Україні, з вивчення генетичної структури порід та породних груп різних видів риб, в Інституті рибного господарства НААН ведеться аналіз генетичного різноманіття за

використання комплексу молекулярно-генетичних маркерів та цитогенетичного аналізу [5, 10, 38-39]. Відпрацьовано методики з відбору біологічного матеріалу і методики виділення ДНК із різних тканин риби, створений банк ДНК різних видів риби, які будуть використовуватись у подальшій роботі при застосуванні ДНК-маркерів для аналізу генофонду риби. Особливої уваги заслуговують локальні популяції риби національної селекції та місцеві форми, котрі володіють високим рівнем популяційного поліморфізму і є цінним джерелом генетичного різноманіття, вони характеризуються високою пристосованістю до умов вирощування, стійкістю та толерантністю до хвороб, унікальними показниками якості продукції. Всі ці ознаки необхідні для покращення сучасних порід та породних груп і створення нових.

Максимально ефективно використання потенціалу популяцій цінних видів риби України неможливе без генетичного контролю, а відсутність генетичного супроводу обліку специфіки формування генетичної структури ускладнює одержання груп особин консолідованих за специфічними породними господарсько-цінними характеристиками.

Дослідження проводяться у наступних напрямках:

1. Аналіз генетичної структури популяцій різних видів риби (короп, амурський сазан, товстолобик, райдужна форель, струмкова форель, харіус, лосось, веслоніс).

Проведення моніторингових досліджень з контролю генетичної структури племінних стад різних видів риби для раціонального використання їх генофонду. Вирішення проблем філогенії та філогенографії.

2. Оптимізація схем схрещування для отримання здорового потомства.

Використання молекулярно-генетичних методів для оптимального підбору схем схрещування дозволяє виключити генетичне виродження популяції через інбридинг.

3. Генетичний моніторинг та оцінка ефективності штучного відтворення.

Система генетичного моніторингу дозволяє оцінити ступінь генетичної спорідненості особин які беруть участь в отриманні статевих продуктів з метою

штучного відтворення, а також ідентифікувати потомство, отримане від генотипованих плідників.

4. Визначення видової приналежності популяцій риб.

5. Підтвердження легального походження червоної ікри від особин вирощених в аквакультури (кета, горбуша, нерка, кижуч, форель та ін.).

6. Визначення вмісту ГМО в рибних продуктах та в кормах різного складу, за використання методу ПЛР у реальному часі (Real-Time PCR).

7. Цитогенетичний контроль екологічної стійкості різних видів риб.

Цитогенетичний контроль хромосомного апарату риб, наявність структурних аберацій і кількісних ушкоджень каріотипу необхідний для генетичної експертизи племінних ресурсів риб і підвищення ефективної племінної роботи.

Дослідження специфіки каріотипу різних видів риб для аналізу рівня кількісного і структурного хромосомного поліморфізму досліджених риб; визначення гомологічних пар аутосом і пар статевих хромосом у досліджених видів риб; вивчення рівня хромосомних і геномних мутацій в лімфоцитах і еритроцитах периферичної крові і з'ясування видової специфічності соматичного мутагенезу.

8. Біоіндикація забруднення водойм за використання мікроядерного тесту.

Мікроядерний тест - показник дестабілізації хромосомного апарату риб, дозволяє оцінити частоту мікроядер індукованих фізичними, хімічними та біологічними мутагенами та використовується як скринінг-система генотоксичної дії кластогенних та анеугенних агентів.

Українськими науковцями відзначається важливість досліджень об'єктів рибництва методами ДНК-маркування [5, 38]. Аналіз поліморфізму та успадкування алельних варіантів анонімних послідовностей геномної ДНК окремих видів риб різних регіонів України за низкою мікросателітних праймерів проводився з використанням ISSR-PCR аналізу. Використання як маркерних систем поліморфних послідовностей нуклеотидів у молекулі ДНК, що дозволяє тестувати генетичний поліморфізм не на рівні продуктів експресії

гена, а на рівні геному, видається перспективним. Результати ISSR-ПЛР аналізу можуть бути використані в селекційному процесі для ідентифікації порід, підбору пар для схрещування з урахуванням їх географічного походження [38]. Тобто, застосування генетико-популяційних методів у рибництві дозволяє вирішувати актуальні рибогосподарські проблеми. Зокрема, роботи з стадами риб, спрямовані на підвищення їх продуктивності, можуть бути реалізовані шляхом збільшення запасу мінливості популяції, необхідної для її розвитку та отримання генетичних ефектів при кросі ліній. Домогтися збільшення генетичної дивергенції селекціонуємих порід та породних груп риб можна методом різноспрямованого добору особин з прижиттєвою оцінкою їх генотипів за конкретним молекулярним маркерами для формування різного аллелофонду.

ВИСНОВКИ

Очевидно, що в збереженні генофондів локальних порід першим принципово необхідним етапом є виявлення породоспецифічних особливостей їхньої генетичної структури. Із цією метою широко використовуються різні типи молекулярно-генетичних маркерів, що послідовно виникають у процесі розвитку молекулярної генетики. Результативність використання їх визначається не їхньою новизною, а відповідністю поставленим завданням. Тобто, перед застосуванням тих або інших варіантів генетичних маркерів необхідно досліджувати коректність їх використання для вирішення конкретних завдань.

Використання у сільському господарстві тільки невеликої частини генофонду риб окремих видів, послідовне зниження внутрішньовидового генетичного різноманіття, а також поширення генетичних захворювань, відсутність аналізу генетичної структури негативно впливає на використання маркерних генів у практиці. Так само як і будь-який інший напрям біології, генетичне маркування пройшло свій логічний історичний шлях починаючи від фенотипових ознак з моногенним успадкуванням, через послідовне наближення до безпосереднього маркування генетичного матеріалу – через імунологічні,

біохімічні маркери до маркерів ДНК. Всі методи генетичної маркування у жодному випадку не замінюють один одного, а тільки доповнюють.

Порівняльний аналіз поліморфізму повторів ДНК широко використовується для оцінки генетичної диференціації між різноманітними групами організмів та оцінки мутаційного тиску. Молекулярно-генетичні маркери на рівні ДНК дозволяють отримувати інформацію про поліморфізм генів і виявляти окремі гени та генні ансамблі, які несуть комплекс цінних ознак. Вони дозволяють проводити адекватну оцінку внутрішньо- і міжпорідної мінливості тварин, особливостей мікроеволюційних процесів, що відбуваються внаслідок породоутворення, та селекційно-плеємінної роботи, спрямованої на поліпшення показників продуктивності в замкнених малочисельних плеємінних стадах. На основі такої інформації можна спрямовано формувати генофонди з бажаними генними поєднаннями.

Як показує огляд літератури, експериментальні дані характеристик популяцій і стад риб, що отримуються методами молекулярної генетики, дозволяє виявити шляхи їхнього походження, визначити ступінь генетичної схожості та величину інбридингу, підтримувати «чистоту» маркованих груп, вивчення еволюційно-генетичних закономірностей, а також відкриває перспективи вивчення генетичних змін в процесі одомашнення, розведення і селекції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Глик В. Молекулярная биотехнология: Принципы и применение / В.Глик, Дж Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
2. FAO, Food and Agricultural Organisation [Electronicresource]. – Modeofaccess: <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cthem/aqua/>
3. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова// Генетика. – 2002. – Т. 38. – № 9. – С. 1173–1195.
4. Паавер Т. Биохимическая генетика карпа (*Cyprinus carpio* L.) / Т. Паавер. – Таллин: «Валгус», 1983. – 122 с.

5. Тарасюк С. І. Молекулярно-генетичні дослідження в рибництві: монографія / С. І. Тарасюк, І. І. Грициняк. – К.: Аграрна наука, 2013. – 312 с.
6. Кирпичников В.С. Биохимический полиморфизм и проблема так называемой неदारвиновской эволюции/ В.С. Кирпичников// Успехи соврем. биологии. – 1972. – 74 (2) – С. 231–246.
7. Bartfay R. Genetic analysis of twoo common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers / R. Bartfay, S. Egedi, G. Yue [et al.] // Aquaculture. – 2003. – Vol. 219. – P. 157–167.
8. Liao X. Generic diversity of common carp from two Chinese lakes and the Yangtze River revealed by microsatellite markers / X. Liao, X. Yu, J. Tong // Hydrobiologia. – 2006. – Vol. 568. – P. 445–453.
9. Глазко В.И. Агроэкологический аспект биосферы: проблема генетического разнообразия/ В.И. Глазко – К.: Нора-принт, 1998. – 209 с.
10. Грициняк І. І. Генетична структура порід і породних груп коропів за окремими генетико-біохімічними системами / І. І. Грициняк, Т. А. Нагорнюк, С. І. Тарасюк // Рибогосподарська наука України. – 2008. – № 1. – С. 29–33.
11. Recent duplication of the common carp as revalved by analyses of microsatellite loci/ L. David, S. Blum, M. W. Feldman [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2003. – 20 (9). – P. 1425–1434.
12. Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations/ Dayu Li, Dahai Kang, QianqianYina [et al.]// Journal of Genetics and Genomics. – 2007. – Vol. 34 (11). – P.984–993. doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60111-8
13. Wall R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale / R. Wall, D. Kerr, K. Bondioli // J. Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80. – P. 2213–2224.
14. Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)/ M.R Mohammadabadi, A. Torabi, M. Tahmourespoor [et al.] // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9(41). – P. 6848–6852.

15. Gurcan E. K. Association between milk protein polymorphism and milk production traits in Black and White dairy cattle in Turkey / E. K. Gurcan // *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 10(6). – P. 1044–1048.
16. Caetano-Anolles G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis/ G. Caetano-Anolles // *Plant Molecular Biology.* – 1994. – Vol. 25. – P. 1011–1026
17. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб / Кирпичников В. С. – Л.: Наука, 1987. – 520 с.
18. Discovery of ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of koi/ K. Mabuchi, H. Senou, T. Suzuki et al. // *J Fish Biol.* – 2005. – Vol. 66. – P. 1516–1528.
19. Bagley M. J. Choice of methodology for assessing genetic impact of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints / M. J. Bagley, S. L. Anderson, B. May // *Exotoxicology.* – 2001. – Vol. 10. – P. 239–244.
20. Глазко В.И. Генетика изоферментов животных и растений / В.И. Глазко, И.А. Созинов. Под ред. А.А. Созинова. – К.: Урожай, 1993. – 528 с.
21. Sulkowska M. K. Isoenzyme Analyses Tools Used Long Time in Forest Science/ M. K. Sulkowska / In K. Ghowsi (Ed.). // *Electrophoresis*, 2012. – P. 157–172.
22. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях/ Ю.П. Алтухов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
23. Серебровский А.С. Генетический анализ/ А.С. Серебровский – М.: Наука, 1970. – 342 с.
24. Кирпичников В.С. Биохимические основы рыбоводства: проблемы генетики и селекции / В.С. Кирпичников – Л.: Наука, 1983. – 200 с.
25. Çiftci Y. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics / Y.Çiftci, I. Okumus // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* – 2002. – N 2. – P. 145–155.

26. Шарт Л. А. О типах трансферринов и эстераз у производителей карпа (*Cyprinus carpio* L.), селекционируемых на устойчивость к краснухе / Л. А. Шарт, Ю. И. Илясов// В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. 1979. – С. 147–151.

27. Корочкин А. И. Генетика изоферментов / А. И. Корочкин, О. Л. Серов, А. И. Пудовкин. – М.: Наука, 1977. – 275 с.

28. Murphy W.J. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping/ W.J. Murphy; R. Stanyon; S.J. O'Brien// Genome Biol. – 2001. – Vol. 2(6). – 2REVIEWS0005. PMID: 11423011

29. Полиморфизм белков, RAPD-PCR и ISSR-PCR маркеров у зубров, бизонов и крупного рогатого скота / В.И. Глазко, Т.Н. Дымань, С.И. Тарасюк [та ін.]// Цитология и генетика. – 1999. – Т.33. – № 6. – С. 30–38.

30. European Patent Application 924026297 Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting / Zabeau M., Vos P. – (Publication number:053458 At).

31. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих/ В. И. Глазко, Е. В. Шульга, Т. Н. Дымань и др.– Белая Церковь: Белоцерк. гос. аграр. ун-т, 2001. – 488 с.

32. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот : пос. для студ. биол. факультетов и учащихся спец. старших классов гимназий/ Л. А. Остерман – М.: МЦНМО. – 2002. – 248 с.

33. Kalendar R. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis/ R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman // Genomics. – 2011. – Vol. 98(2). – P. 137–144.

34. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by RFLP analysis and a new set of microsatellite markers/ L. David, P. Rajasekaran, J. Fang et al. // Mol. Gen. Genet. – 2001. – Vol. 266. – P. 353–362.

35. Desvignes J. F. Genetic variability in realred stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites / J. F. Desvignes,

J. Laroche, J. D. Durand, Y. Bouvet // *Aquaculture*. – 2001. – Vol. 194. – P. 291–301.

36. Yue G. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. / G. Yue, M. Ho, L. Orban // *Aquaculture*. – 2003. – Vol. 234. – P. 85–98.

37. Penman D. J. Progress in carp genetics research / D. J. Penman // In: *Carp genetics resources for aquaculture in Asia*. World Fish Center, Penang, Malaysia. – 2005. – P. 24–58.

38. Інформативність мікросателітних маркерів для аналізу генетичної структури популяцій білого (*Hypophthalmichthys molitrix*) та строкатого (*Aristichthys nobilis*) товстолобиків / І.І. Грициняк, О. В. Залоїло, С.І. Тарасюк та ін. // *Міжвід. наук. зб. «Розведення і генетика тварин»*. – 2015. – №50. – С. 118–125.

39. Маріуца А. Е. Порівняльна характеристика генетичної структури українських лускатих і малолускатих порід коропа господарства «Іркліівський рибозплідник рослинорідних риб» / А.Е. Маріуца, О.В. Залоїло, С. І. Тарасюк // *Рибогосподарська наука України*. – 2011. – №3. – С. 80–84.

АКТУАЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В АКВАКУЛЬТУРЕ

С.И. ТАРАСЮК¹, Е.Ю. БЕЛИКОВА², С.О. КОЛЕСНИК¹

¹Институт рыбного хозяйства НААН Украины, г. Киев

²Национальный авиационный университет, г. Киев

В представленной статье рассмотрены состояние и перспективы современных молекулярно-генетических исследований в аквакультуре, краткий обзор способов изучения генетической структуры при использовании различных типов маркеров.

В результате использования молекулярно-генетических маркеров можно оценить внутривидовой генетический полиморфизм, осуществить

паспортизацию ремонтно-маточных стад и дальнейшее формирование родительских пар производителей по альтернативным генотипами с целью повышения качества генетического материала племенных ресурсов рыб для контроля эффективности воспроизводства в условиях отечественных рыбоводческих хозяйств.

Ключевые слова: *молекулярные маркеры, молекулярно-генетический полиморфизм, генотип, генетическая структура, молекулярно-биохимические методы, аквакультура.*

ACTUALITY OF MOLECULAR GENETIC STUDIES IN AQUACULTURE

S. TARASJUK¹, O. BIELIKOVA², S. KOLISNYK¹

¹Fishing Industry Institute NAAS of Ukraine, Kyiv

²National Aviation University, Kyiv

In the present article, it was considered the state and prospects of modern molecular genetic research in aquaculture, an overview of the methods of studying the genetic structure by using different types of markers.

As a result of the use of molecular genetic markers, it is possible to evaluate intraspecific genetic polymorphism, to carry out the certification of repair broodstocks and further formation of parent pairs of producers by alternative genotypes in order to improve the quality of the genetic material of fish tribal resources in order to control the reproduction efficiency in the conditions of domestic fish farms.

Key words: *molecular markers, molecular genetic polymorphism, genotype, genetic structure, molecular-biochemical methods, aquaculture.*