

ДНК-маркирование канального сома

Е.В. Хмелева, кандидат сельскохозяйственных наук

Н.И. Бескровная, кандидат биологических наук

В.Т. Сметанин, доктор биологических наук

Н.А. Сидоров, С.В. Гушак, научные сотрудники

Днепропетровский госагроуниверситет – Институт рыбного хозяйства

УААН, г. Киев, – ОАО “Днепрорыбхоз”

Стверджується, що досліджуваний мікросателітний локус генома канального сома може бути використаний як міжвидовий маркер. Подальші дослідження потрібно продовжити в напрямі пошуку ДНК-маркерів канального сома і проведенні їх оцінки на придатність використання як селекційних маркерів певної спрямованості.

Применение генетико-популяционных методов в рыбоводстве позволяет решать актуальные рыбохозяйственные проблемы. В частности, работа с промышленными стадами рыб, направленная на повышение их продуктивности, может быть реализована путем увеличения запаса изменчивости популяции, необходимой для ее развития, и получения генетических эффектов при кроссе линий. Добиться увеличения генетической дивергенции селекционируемых линий рыб можно методом разнонаправленного отбора особей с прижизненной оценкой их генотипов по конкретным молекулярным маркерам для формирования различного аллельного фонда в одних и тех же локусах.

Традиционные селекционные программы выращивания рыб служат основой для применения методов количественной генетической изменчивости для сельскохозяйственного производства [1, 2]. Существует значительный потенциал генетически усовершенствованных методик: для роста продуктивности канального сома селективное выращивание, манипуляции с хромосомами, гибридизация, производство однополых групп и перенос генов [3]. Современные молекулярные методы позволяют установить родственные взаимосвязи особей, а генетические карты геномов идентифицировать генетические маркеры заданных признаков и определить критерии отбора для селективного воздействия на рыб [4].

Молекулярные карты генов домашних животных являются основой для их селективного разведения. Первоначальные карты сцепления генов, основанные на ДНК-маркерах для рыб тилапия и радужная форель [5] опирались преимущественно на маркеры, выявленные методом ПЦР с произвольными праймерами (RAPD) или методом полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP). Эти маркеры представляют собой последовательности анонимной ДНК, которые являются доминантными

маркерами и могут быть видоспецифичными для картируемой популяции животных, в том числе и для рыб. Как RAPD-, так и AFLP-маркеры, характерные для канального сома, демонстрируют низкие уровни внутривидового полиморфизма [6, 7]. Альтернативой является карта сцепления генов канального сома, основанная на микросателлитных локусах.

Микросателлитные локусы – это полиморфные последовательности ДНК, содержащие короткие повторяющиеся последовательности. Микросателлитные локусы распределены по консервативным, мало изменяющимся регионам ДНК геномов и могут демонстрировать высокие уровни внутривидового аллельного полиморфизма. Уникальные последовательности ДНК, расположенные по границам фланкирующих повторов, могут быть использованы для идентификации и дальнейшей характеристики геномных регионов, окружающих эти локусы. Карты сцепления генов, основанные на микросателлитах, были разработаны для радужной форели и полосатого данио; микросателлитные локусы включены в карту сцепления генов тилапии [8].

Одним из методов, позволяющих без определения конкретной последовательности ДНК получить индивидуальный для каждой особи электрофоретический спектр, является ISSR-PCR (полимеразная цепная реакция с использованием микросателлитных локусов как участков отжига праймеров и амплификации участков между их инвертированными повторами; как правило, это уникальная ДНК). Праймеры состоят из короткого мотива, комплементарного микросателлитному повтору, и нескольких (1–4) якорных нуклеотидов на 5'- или 3'-конце, которые определяют место отжига праймера. Мультилокусные спектры амплификации, получаемые в ISSR-PCR, насчитывают 10–60 полос, которые разделяют в агарозном или полиакриламидном геле [9]. Преимущество метода по сравнению с RAPD-PCR заключается в том, что такой подход увеличивает точность отжига, воспроизводимость амплифицированных участков, поскольку о них известно, что это относительно короткие фрагменты ДНК, заключенные между инвертированными повторами микросателлитного локуса [10]. Для проведения амплификации необходимо небольшое количество ДНК (5–50 ng на 1 реакцию). При этом не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности при дизайне праймеров. Амплифицируются как структурные, так и некодирующие участки генома [10].

Однако получаемый спектр ампликонов имеет определенные ограничения, связанные с условиями амплификации; в частности, недоступными для анализа являются фрагменты слишком большой длины (2,5–3 kb).

Маркеры ISSR-PCR получили широкое распространение для таксономического и филогенетического сравнения и как средство картирования широкого спектра организмов, чему способствовали такие свойства метода ISSR-PCR, как относительно высокая точность и воспроизводимость, высокий уровень полиморфизма. Посредством ISSR-

PCR получены геномные отпечатки ряда животных, как млекопитающих, так и рыб [10].

Канальный сом (*Ictalurus punctatus*, Raf. 1818), завезенный из США в 1972 году, является ценным объектом товарного рыбоводства. Климатические условия Украины, главным образом южных ее областей, позволили говорить о сходности режимов водоемов в этих районах и центральных штатах США, что явилось предпосылкой к началу исследований по акклиматизации канального сома. Он проявил себя в новых условиях как быстрорастущий вид, отличающийся хорошими вкусовыми качествами, способностью эффективного использования искусственных комбикормов на рост, легкостью получения потомства, несложной технологией выращивания. Рыбопродуктивность при выращивании его в садках и бассейнах тепловодных хозяйств достигала 90–150 кг/м² при затратах корма 2–2,8 единицы [11, 12].

Вследствие сложившейся экономической обстановки в Украине, значительного удорожания искусственных комбикормов для рыб, высокой энергоемкости индустриального рыбоводства значительно сократилось количество тепловодных садково-бассейновых хозяйств, занимающихся разведением канального сома. Это привело к снижению генетического разнообразия промышленных стад производителей канального сома и, следовательно, снизило продуктивные качества выращиваемой товарной рыбы.

Для выхода из сложившейся ситуации необходимо применение наиболее современных и совершенных способов мониторинга генетических процессов, протекающих в искусственно воспроизводимых популяциях и промышленных стадах канального сома. Речь идет прежде всего о молекулярной генетике и паспортизации всех производителей, которые участвуют в процессе искусственного воспроизводства. Эти методы эффективны применительно к по-прежнему перспективному направлению промышленного выращивания канального сома. Они позволяют эффективно использовать его промышленное двухлинейное разведение, направленное на использование эффекта гетерозиса у гибридов первого поколения от скрещивания двух генетически различных линий [13].

Система двухлинейного разведения сопряжена с проблемой надежной маркировки линий. У канального сома удобным признаком – маркером чистоты линии – может служить признак альбинизма, который рано проявляется в онтогенезе. Это позволяет проводить отбор альбиносической линии еще на личиночной стадии развития рыб.

Цель наших исследований было воспроизводство стада производителей канального сома, содержащегося в бассейновых условиях Приднепровского тепловодного рыбного хозяйства. Для воспроизводства используется метод двухлинейного разведения, направленного на использование эффекта гетерозиса у гибридов первого поколения от скрещивания двух генетически различных линий, а также на дальнейшее формирование промышленного

стада, свободного от генетического груза вследствие вероятных случаев близкородственного скрещивания.

Это возможно при условии создания генетически различных родительских линий, обладающих альтернативным генотипом по конкретным ДНК-маркерам, ассоциированным с окраской особей. С этой целью нами было проведено типирование канального сома стада с целью выявления у них специфических участков ДНК, которые могли стать селективно значимым маркером. Для этого были отобраны фрагменты хвостовых плавников у особей различной окраски – темной, мраморной и альбиноотической.

Материалы и методы исследования. Определение и адаптацию условий проведения ISSR-PCR-типирования при изучении полиморфизма спектра ISSR-фрагментов генома различных морф окраски канального сома (*Ictalurus punctatus*, Raf. 1818) осуществляли в лаборатории молекулярной генетики Института свиноводства УААН (В.Н. Балацкий с коллегами).

ДНК из плавников канального сома выделяли по методике с использованием реагента “Chelex-100”, которая [14], позволила значительно сократить срок проведения тестирования рыб.

В пластиковую пробирку Eppendorf 1,5 мл к 50 г навески плавника добавляли 170–180 мкл 5%-го стерильного водного раствора Chelex-100 и инкубировали на протяжении 6 часов при 56 °С. Периодически тщательно перемешивали на Vortex. Выдерживали 8 мин на водяной бане при 100 °С. Снова тщательно перемешивали встряхиванием на Vortex, после чего центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин. Для амплификации использовали 3 мкл надосадочной жидкости. Сохраняли образцы при –20 °С, после каждого размораживания образцы перемешивали и центрифугировали 5 мин при 8 об/мин.

В качестве праймера для РСР-амплификации, который позволил бы получать индивидуальные для каждой особи электрофоретические спектры, нами был использован тринуклеотидный праймер с первичной последовательностью (AGC)₆G.

Реакционная смесь объемом 25 мкл состояла из следующих компонентов: реакционный буфер – 2,5 мкл; 50 mM MgCl₂ – 0,5 мкл; 2,5 mM dNTPs – 2,5 мкл; праймер (S2) – 0,5 мкл; термостабильная полимеразы – 0,3 мкл; ДНК – 3 мкл (выделена при помощи реагента Chelex-100); деионизированная вода до полного объема.

РСР проводили в амплификаторе в условиях следующего температурного режима: денатурация – 2 мин при 94 °С; 30 циклов отжига – 30 с при 94 °С, 30 с при 56 °С, 2 мин при 72 °С; элонгация – 4 мин при 72 °С.

Продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле в 1 ТВЕ при 20–22 мА с последующим окрашиванием геля бромистым этидием, визуализацией в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотодокументированием. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК фага λ/Pst 1 и λ/Eco 471.

Результаты исследований и их обсуждение. Использование нами праймера $(AGC)_6G$, в силу его информативности в отношении микросателлитных локусов геномной ДНК овец, свиней и других сельскохозяйственных животных [10], при изучении генетических особенностей канального сома на уровне первичного строения ДНК не выявило индивидуальных различий по частотам ISSR-PCR-маркеров у особей разных цветовых морф окраски его тела – альбинотической, мраморной, темной: спектры их ампликонов были одинаковыми. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный исследованный локус может быть межвидовым маркером.

Несмотря на то, что применение праймера $(AGC)_6G$ не выявило селективного маркера для отбора производителей по окраске, перспективы применения этой методики для паспортизации производителей очевидны. Об этом свидетельствуют и результаты исследований американских ученых [8]. Они идентифицировали микросателлитные локусы канального сома в генетических последовательностях или произвольных клонах из небольшой части библиотеки геномной ДНК. Аутбредные популяции канального сома содержали в среднем 8 аллелей на локус и обладали средним уровнем гетерозиготности 0,70. Была составлена карта сцепления генов генома канального сома ($N = 29$) из двух эталонных семейств. Все 293 микросателлитных локуса оказались полиморфными у одного или обоих семейств со средним количеством информативных мейозов на локус – 171. Как считают авторы, микросателлитные локусы и карта сцепления генов повысят эффективность маркерных программ по селекции (MAS) и разведению канального сома [8].

Обнаружены также высокие уровни аллельного полиморфизма и фенотипической изменчивости в селекционных и товарных популяциях канального сома [15]. Это будет способствовать совершенствованию маркерно-селективных программ разведения рыб. 70 % полиморфных микросателлитных маркеров были на 0,6 % или более информативными в полиморфном аспекте. Высокий процент новых полиморфных маркеров, помещенных на карту сцепления, обеспечит более высокую эффективность селекционных программ. Эта эффективность уже доказана при идентификации особей рыб и исследовании икры канального сома на достоверность происхождения [16].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованный микросателлитный локус генома канального сома может быть использован в качестве межвидового маркера. А дальнейшие исследования необходимо продолжить в направлении поиска ДНК-маркеров канального сома и проведении их оценки на пригодность использования в качестве селекционных маркеров определенной направленности.

Библиография

1. *Bondari K.* Response of channel catfish to multi-factor and divergent selection of economic traits / K. Bondari // *Aquaculture*. – 1986. – 57. – P. 163–170.
2. *Wolters W.R.* Analysis of a diallel cross to estimate effects of crossing on resistance to enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* / W.R. Wolters, M.R. Johnson // *Aquaculture*. – 1995. – 137. – P. 263–269.
3. *Gjedrem T.* Selective breeding to improve aquaculture production / T. Gjedrem // *Aquaculture*. – 1997. – 28. – P. 33–45.
4. *Danzmann R.G.* Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout / R.G. Danzmann, T.R. Jackson, M.M. Ferguson // *Aquaculture*. – 1999. – 173. – P. 45–58.
5. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) / T.D. Kocher, W.-J. Lee, H. Sobolewska [et al.] // *Genetics*. – 1998. – 148. – P. 1225–1232.
6. Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids / Z. Liu, P. Li, B.J. Argue [et al.] // *Anim. Genet.* – 1998a. – 29. – P. 58–62.
7. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and back cross hybrids / Z. Liu, A. Nichols, P. Li [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1998b. – 258. – P. 260–268.
8. A Microsatellite-Based Genetic Linkage Map for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* / G.C. Waldbieser [et al.] // *Aquaculture*. – 1999. – 32. – P. 43–49.
9. *Zietkiewicz E.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics*. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183.
10. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / [В.И. Глазко, Е.В. Шульга, Т.Н. Дымань, Г.В. Глазко]. – Белая Церковь, 2001. – С. 66–67.
11. *Галасун П.Т.* Методические рекомендации по биотехнике разведения и выращивания сеголеток канального сома во внутренних водоемах УССР / П.Т. Галасун, В.В. Грусевич. – Львов: Изд-во УкрНИИРХ, 1978. – 25 с.
12. *Грусевич В.В.* Технологія відтворення канального сома у внутрішніх водоймах України / В.В. Грусевич, М.А. Сидоров, Н.В. Доценко // Збірник інструктивно-технологічної документації “Інтенсивне рибництво”. – К.: Аграрна наука, 1995. – С. 98–122.
13. Использование альбиносов канального сома для двухлинейного разведения: рекомендации / [Н.Ф. Дубовик, Ю.И. Илясов, С.Ш. Михайлова, В.Н. Петин]. – М.: Изд-во ВНИИРХ, 1990. – 8 с.
14. *Walsh P.S.* Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material / P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques*. – 1991. – № 10. – P. 506.
15. *Waldbieser G.C.* Cloning and characterizing terization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus* / G.C. Waldbieser, B.G. Bosworth // *Anim. Genet.* – 1997. – 28. – P. 295–298.

16. *Waldbieser G.C.* Application of polylinkage morphic microsatellite loci in a channel catfish, *Ictalurus punctatus*, breeding program. J. / G.C. Waldbieser, W.R. Wolters // *Aqua. Soc.* – 1999. – 30. – P. 256–262.