

ВИКОРИСТАННЯ ISSR-АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВНУТРІШНЬО-ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ РІЗНИХ ГРУП КУЛЬТУРНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ЧЕРВ'ЯКІВ РОДУ *EISENIA*

К. І. ТИМЧИЙ, науковий співробітник кафедри біотехнології
Український державний хіміко-технологічний університет,
м. Дніпро

О. І. МЕТЛИЦЬКА, доктор сільськогосподарських наук, професор
С. М. КОРИННИЙ, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
м. Полтава

В. Т. СМЕТАНІН, доктор сільськогосподарських наук, професор
Український державний хіміко-технологічний університет,
м. Дніпро
E-mail: holoddnepr@i.ua

Анотація. Відомо, що молекулярно-генетичні методи здатні забезпечити дослідників новими та більш точними засобами для розмежування видів дощових черв'яків та встановлення філогенетичних відстаней між ними.

Тому досліджували застосовуючи нейтральні молекулярні маркери, ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat) внутрішньо-генетичний поліморфізм дощових черв'яків роду *Eisenia* з масиву вермікультури кафедри біотехнології, які були опромінені лазером типу ЛГН-208Б за різними експозиціями у часі та культивувались на різних органічних субстратах.

Застосування методу ISSR-ПЛР полягає у використанні мікросателітних локусів як ділянок випалу праймерів, комплементарних мікросателітним повторам. Такі праймери дають можливість ампліфікації фрагментів ДНК, які розташовані між мікросателітними послідовностями. Отримані паттерни є видоспецифічними.

Дослідження показали, що лінія тварин має досить високий рівень гетерогенності, не зважаючи на те, що походить з шести особин одного масиву, саме дія лазерного опромінення і жорсткий субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску.

Ключові слова: генетична мінливість, молекулярні маркери, мікросателітні локуси

Актуальність. Генетична різноманітність популяції визначає її здатність адаптуватися до безпосереднього оточення в процесі природного відбору. За низьких показників внутрішньо-популяційного поліморфізму знижується кількість можливих комбінацій генів, які сприяють адаптації до навколишнього середовища, та зменшують ймовірність того, що в цій популяції виникнуть нові пристосовані генотипи. Таким чином, популяція в природних умовах потребує відповідного рівня генетичного різноманіття для виживання під тиском постійно мінливих біотичних і абіотичних компонентів

екосистеми. В процесі штучного відбору сільськогосподарських тварин спостерігаються закономірності, аналогічні тим, які відбуваються в природних популяціях. Серед генетично-поліморфних зразків селекційних популяцій виділяються індивідуальні генотипи, що володіють ознаками, які дозволяють даній сільськогосподарській культурі виживати в умовах запрограмованих навколишнім середовищем або успішно протистояти стрес-факторам. Тому за розробки ефективних селекційних програм необхідні джерела генетичної різноманітності [13].

Рівень генетичного поліморфізму як природних популяцій, так і культурних найбільш ефективно визначається за допомогою ДНК-маркерів. Крім оцінки біорізноманіття, молекулярні маркери застосовуються для дослідження походження, доместикації видів і їх подальшої міграції, отримання інформації щодо філогенетичних взаємин між видами, а також для географічної локалізації популяцій, що мають різне генетичне походження [11].

Застосування нейтральних молекулярних маркерів, таких як ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat), порівняно рівномірно розподілених за геномом безхребетних, дозволяє одночасно визначити мінливість за групою не пов'язаних між собою локусів, що особливо цінно для збереження і використання генетичних ресурсів. Така інформація дає можливість оцінити генетичний дрейф, що відбувається в екосистемах, а також ефективно проводити моніторинг культурних популяцій і ліній сільськогосподарських тварин [1].

Для створення ISSR-маркерів використовують праймери, комплементарні мікросателітним повторам (4-12 одиниць повтору) і несуть на одному з кінців послідовність з двох-чотирьох довільних нуклеотидів (так званий "якір"). Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти унікальної ДНК, які знаходяться між двома досить близько розташованими мікросателітними послідовностями. В результаті ампліфікують велике число фрагментів, представлених на електрофореграмі дискретними смугами (ISSR-фінгерпрінтинг). Отримані ПЛП-продукти відносяться до маркерів домінантного типу успадкування, поліморфізм яких тестується за наявності / відсутності смуги. Для створення ISSR-маркерів не потрібно попереднього знання нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК. Метод має гарну відтворюваність і може бути з успіхом використаний для виявлення міжвидової і внутрішньо-видової генетичної мінливості, ідентифікації біооб'єктів різного таксономічного рангу, а в ряді випадків і для індивідуально гогенотипування [7, 8].

У зв'язку з тим, що існує багато суперечливих даних видової приналежності в систематиці сімейства Lumbricidae метою даного дослідження є аналіз інформативності ISSR-маркерів за дослідження всередині-генетичного поліморфізму культурної популяції ліній дощового черв'яка роду Eisenia, які культивуються на жорстких субстратах різної органічної природи [14].

Мета дослідження – дослідити генетичний поліморфізм популяції черв'яків роду Eisenia, яка сформована із шести тварин початкового масиву методом розведення „в собі.”

Матеріали та методи дослідження. Біологічний матеріал для досліджень сформовано наступним шляхом. Спочатку було 6 статевозрілих особин невизначеного виду роду *Eisenia* і шляхом культивування масив тварин розмножили до 300 особин. Потім з масиву відібрали 120 не статевозрілих тварин, яких розділили за групам 20 особин у групі. На кожен з груп подіяли лазером ЛГН-208Б з довжиною хвилі 0,63 мкм та потужністю випромінювання 1 мВт., за експозиціями: 5; 10; 15; 20; 25; 30 хвилин опромінення. Черв'яків цих груп увесь час культивували на двох різних субстратах: звичайний ґрунт + органічні відходи та донні поклади водоймища + органічні відходи. Наступне покоління F1 від кожної батьківської групи відібрали і також культивували на аналогічних субстратах.

Для досліджень за ISSR праймерами були використані такі зразки:

1-група експерименту: тварини утримувались на субстраті ґрунт і не були опромінені;

2-група: тварини були опромінені лазером 15 хвилин і утримувались на субстраті ґрунт;

3-група: F1 (перше покоління, батьки опромінені лазером протягом 15 хвилин) утримувались на субстраті «ґрунт»;

4- група: тварини утримувались на субстраті «донні поклади» і не підлягали лазерному опроміненню;

5-група: тварини були опромінені 15 хвилин і утримувались на субстраті «донні поклади»

6-а група:F1 (перше покоління, батьки опромінені 15 хвилин) утримувались на субстраті «донні поклади»

7-група: технологічний вид, що штучно культивується на одній із промислових верміферм.

Виділення ДНК. Виділення ДНК із біологічного матеріалу (особини не визначеного виду роду *Eisenia*) проводили з використанням стандартного комерційного набору "ДНК-сорб В", ("Амплісенс", НДІ Епідеміології, Москва, Росія) наступним чином.

Кожен зразок ДНК отримували із однієї особини. Матеріалом для роботи слугували всі тканини черв'яків, які зберігалися в етанолі за температури мінус 18-20°C. Перед процедурою екстракції ДНК, біологічні проби ретельно розтирали у скляному гомогенізаторі.

Методика ISSR-аналізу. Ампліфікацію ДНК проводили шляхом ISSR-ПЛР у 25 мкл реакційної суміші. Склад реакційної суміші для проведення ISSR-ПЛР (з використанням комерційного набору «ThermoFisherScientific» (Fermentas) (Масачусетс, США): реакційний буфер Phusion (2 од/мкл) із 7,55 мМMgCl₂ –2,5мкл. Суміш dNTP – 3,0 мкл; 100 пМпраймера – (0,5-1,0)мкл; від 2 до 4 одиниць активності Tag-полімерази – (2,0-4,0)мкл; (0,1-0,2нг) ДНК-зразка – (1-3) мкл; вода деіонізована (в необхідній кількості до досягнення загального об'єму суміші 25мкл). Структура праймерів, що були використані для генетичного аналізу особин різних груп роду *Eisenia* та їх кодові позначення, наведені в табл.1.

1. Структура і температурний режим випалювання ISSR праймерів, використаних в роботі

Назва праймерів	Структура праймерів	%GC	Температура випалювання
S1	3'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCC-5'	68,42	57
S2	3'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-5'	68,42	57
S3	3'-ACC ACC ACCACCACCACC G-5'	68,42	60
S5	3'-ATGATG ATGATGATGATG C-5'	36,84	57
UBC873	3'- GAC AGA CAG ACA GAC A-5'	50,00	60

Програма ампліфікації була наступна: за праймерами S3, UBC 873: 1 цикл: 94 °C - 4хв; 2 - 31 цикл: 60°C- 2хв; 72°C – 4хв; 94°C – 1хв; 32 цикл : 60°C - 3хв; 72°C - 7хв.

Програма ампліфікації за праймерами S1, S2, S5: 1 цикл: 94°C - 4хв; 2 - 31 цикл: 57°C - 2хв; 72°C – 4хв; 94°C – 1хв; 32 цикл: 57°C - 3хв; 72°C - 7 хв.

Електрофоретичне розділення ампліфікованих ділянок ДНК в технології ISSR проводили у 2 %-вому агарозному гелі у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0.0879 М Тріс, 0.089 М борна кислота, 0.002 М ЕДТА рН 8.0) [5, 6].

Статистичний аналіз даних. ISSR-профілі відображали на папері з нанесеною міліметровою сіткою у масштабі 1:2, згідно відстані в мм між смугами маркера молекулярної маси. Для визначення алельних частот і проведення генетико-популяційного аналізу на основі опрацьованих ISSR-профілів окремих особин кожної групи дослідів створювали матрицю вихідних даних для їх розрахунку за присутності (1) або відсутності (0) смуги в певному положенні профілю. Матрицю вихідних даних вносили у відповідний файл стандартної комп'ютерної програми GELSTAT призначеної для обробки даних полілокусного типування [15].

Результати дослідження та їх обговорення. Оцінка інформативності а отже придатності кожного ISSR праймера для проведення подальшого міжмікросателітного аналізу з визначення рівня генетичного поліморфізму кожної групи дослідів особин роду *Eisenia* виконувалася шляхом використання техніки приготування ДНК-сумішей, яку було описано вище. Найбільш придатними для ідентифікації генетичної різниці між дослідними групами, залежно від використаних факторів зовнішнього тиску на обрані мікропопуляції, виявилися праймери, що складаються із фрагментів мікросателітних локусів (AGC) 6 С і (GACA) 4, тобто S1 та UBC873. Відмітимо, що за допомогою праймера S1 нами було ідентифіковано сумарно лише 9 продуктів ампліфікації, проте, лише один з виявлених локусів був мономорфним, а загальна частка поліморфних локусів була максимальною серед виявлених іншими застосованими ПЛР-праймерами і склала 88,9 % (табл. 2).

2. Інформативність ISSR- праймерів, що застосовані у досліді

Структура праймерів	Загальна кількість паттернів	Кількість мономорфних локусів	Кількість поліморфних локусів	Частка поліморфних локусів

S1:(AGC) ₆ C	9	1	8	88,9
S2:(AGC) ₆ G	16	4	12	75,0
S3: (ACC) ₆ G	12	3	9	75,0
S5: (ATG) ₆ C	20	5	15	75,0
UBC873: (GACA) ₄	13	3	10	76,9

Високим рівнем інформативності виявився також і тетрануклеотидний безякірний праймер (GACA)₄, що дозволив отримати ДНК-паттерни із загальною кількістю 13 ампліконів, водночас частка виявлених поліморфних локусів сягала 76,9 %.

Внутрішньовидова неоднорідність серед аналізованих груп дощового черв'яка роду *Eisenia*, що виявлена за допомогою ISSR-маркерів, відображена в таблиці 3, у якій представлені середні генетичні дистанції між генотипами всередині досліджуваного виду, та генетичні дистанції між проаналізованими групами.

За зіставлення характеру розподілу розрахованих частот алелей (ампліконів) у представників різних груп дослідження особливу увагу привертає порівняльна характеристика представників суміжних генерацій: 2 і 3 групи експерименту – особини, що підлягали дії лазерного опромінення протягом 15 хвилин та їх потомки, 5 і 6 групи – особини, що вирощувалися на донних покладах і підлягали дії лазерного опромінення та їх потомки, відповідно.

У особин третьої групи були виявлені амплікони розміром 1120 п. н., що зустрічалися із частотою 0,4 у даній виборці, проте, були відсутні у їх батьків взагалі. Водночас виявлена різниця не була статистично вірогідною (за критерієм Фішера). У представників 5 і 6 груп спостерігалася аналогічна тенденція за цим генетичним локусом: частота амплікону 1120 п. н. дорівнювала 0,2 у батьківських форм, що підлягали дії лазерного опромінення і вирощувалися на збідненому субстраті у вигляді донних покладів, проте у їх потомків першого покоління частота цього алеля сягала 0,6 (різниця порівняно із 2 групою вірогідна, $p < 0,5$).

3. Порівняння частоти та розмірів ДНК-фрагментів технології ISSR з праймерами S1, S2, S3, S5, UBC 873 особин роду *Eisenia*.

№ ДНК-фрагменту	Розмір ДНК-фрагменту	Групи тварин						
		1	2	3	4	5	6	7
1	3000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
2	2700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200	0,200
3	2300	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
4	1550	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
5	1425	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,200	0,600
6	1310	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000 ^a	0,400*	0,200
7	1200	0,600	0,600	0,600	0,600	0,800	0,600	0,600
8	1120	0,200	0,000^a	0,400*	0,200	0,200	0,600*	0,400
9	1080	0,400	0,200	0,600	0,400	0,200	0,400	0,400
10	1040	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,200
11	1000	0,200	0,400	0,400	0,200	0,000^a	0,600*	0,400
12	975	0,400	0,400	0,400	0,200	0,200	0,000	0,200

13	950	0.200	<u>0.400</u>	<u>0.000</u>	0.400	0.200	0.600	0.400
14	925	0.200	0.200	0.000	0.000	<u>0.400</u>	0.000	0.000
15	900	0.400	0.400	0.600	0.400	0.200	0.400	0.400
16	875	<u>0.000</u>	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.200	0.200	0.200
17	840	0.400	0.200	0.400	<u>0.600</u>*	0.200	0.200	0.200 ^a
18	800	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	0.600	0.400
19	770	0.200	0.200	0.400	0.200	0.400	0.400	0.400
20	655	0.400	0.200	0.200	0.200	0.200	0.400	0.200
21	635	0.000	0.000	0.200	0.200	0.000	0.200	0.000
22	600	0.200	0.200	0.200	0.200	0.000	0.200	0.200
23	595	0.000	0.000	0.000	<u>0.200</u>	0.000	0.000	0.000
24	575	0.200	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.200	0.200	0.200
25	565	0.200	0.200	0.200	<u>0.000</u>	0.200	0.000	0.200
26	540	<u>0.000</u>	0.400	0.400	0.400	0.400	0.200	0.200
27	525	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000	0.200
28	520	0.400	0.200	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000
29	500	<u>0.200</u>	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400	<u>0.600</u>*
30	440	0.200	0.400	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
31	410	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000
32	370	0.000	0.000	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000
33	360	0.200	0.200	0.200	0.000	0.000	0.200	0.200
34	325	0.000	0.000	0.200	0.200	0.200	0.200	0.000
35	300	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.200
36	250	0.000	0.000	<u>0.2000</u>	0.000	0.000	0.000	0.000

Примітка: $P < 0,5$, критерій Фішера

Суттєва, але невірогідна різниця була зафіксована нами за частотою розподілу алелі розміром 1310 п. н. у особин суміжних генерацій (групи 5 і 6): у батьківських особин ця алель була відсутня, проте, у потомків першого покоління її частота уже складає 0,4. Аналогічні закономірності спостерігалися за частотами розподілу алелей у 5 і 6 груп досліджу: частоти ампліконів розміром 1080 і 1040 п.н. збільшилися вдвічі проти цих показників у батьківських форм за статистично невірогідної різниці.

За частотою розподілу алелі розміром 1000 п. н. зафіксовано статистично вірогідну різницю: у батьківських форм (група досліджу 5) ця алель була відсутня, а у потомків першого покоління (група 6) її частота сягала 0,6 ($p < 0,5$). Алель розміром 925 п.н., що зустрічалася у особин 5 групи з частотою 0,4 була елімінована повністю у їх потомків. Відмітимо, що аналогічні тенденції нами спостерігалися для 2 і 3 груп досліджу – алель розміром 925 п. н. зустрічалася у 20 % батьківських форм 2 групи досліджу, проте у їх потомків вона не виявлена взагалі.

Унікальні алелі розміром 3000 п. н. та 595 п. н. були виявлені із частотою 0,2 лише у представників 4 групи, що вирощувалися на збіднених субстратах (донні поклади). Також виявилася унікальною алель розміром 250 п. н., яка нами ідентифікована у 20 % особин 3 групи.

Отже, виходячи із проведеного порівняльного аналізу частотного розподілу алелей слід зауважити, що дія лазерного опромінення і збіднений субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску, які призвели до втрати/появи нових алелей та суттєвим

змінам їх частот за окремими генетичними локусами у потомків першого покоління.

Надзвичайно цікавим виявився результат аналізу показників генетичної схожості між різними групами особин роду *Eisenia* табл. 4.

4. Рівні генетичної схожості за результатами ISSR типування особин різних груп досліджу роду *Eisenia*

Рівні схожості	1	2	3	4	5	6	7
1	0,000	0.262	0.261	0.247	0.245	0.268	<u>0.253</u>
2		0,000	0.278	0.277	0.275	0.263	0.273
3			0,000	0.289	0.282	0.291	0.301
4				0,000	0.265	0.265	0.270
5					0,000	0.256	0.277
6						0,000	0.314
7							0,000

Найнижчий рівень генетичної схожості був визначений між представниками контрольної батьківської групи та особинами четвертої і п'ятої груп (наступне покоління, вирощені в стандартних умовах, які надалі підлягали впливу різних факторів добору): 0,247 та 0,245, відповідно. Не виключно, що це є свідченням існування природних механізмів підтримки генетичної мінливості в популяціях особин роду *Eisenia*. Найбільш генетично подібними виявилися особини 7 групи (черви, що вирощувалися в стандартних умовах технічної верміферми) та представники вибірки 6 групи (потомки батьківських форм 5 групи, що вирощувалися на донних покладах і підлягали дії лазерного опромінення). Фактор збільшення генетичної подібності може бути пояснений неможливістю уникнення інбридингу і переходу алелей більшості локусів у гомозиготний стан при тучному вирощуванні черв'яків на верміфермах, особливо за використання незбалансованих, органічно збіднених субстратах.

Висновки і перспективи. Використання нейтральних молекулярних маркерів, таких як ISSR, порівняно рівномірно розподілених за геномом дощового черв'яка роду *Eisenia*, дозволяє одночасно визначити генетичну мінливість серед груп тварин, яка, в свою чергу, є підтвердженням, що дія лазерного опромінення і жорсткий субстрат вирощування (донні поклади) виявилися потужними факторами селективного тиску, та призвели до втрати/появи нових алелей і суттєвих змін їх частот за окремими генетичними локусами. Теоретична концепція результату представлених досліджень може бути використана як фактор відбору для отримання генетичної мінливості серед закритих популяцій дощових черв'яків, які культивуються у вермігосподарствах.

References

1. Altukhov YU. P. Polimorfizm DNK v populyatsionnoy genetike / YU. P. Altukhov, Ye.A. Salmenkova // Genetika. – 2002. – Т. 38. – S. 1173–1195.
2. Bannikova A.A. Molekulyarnyye markery i sovremennaya filogenetika mlekopitayushchikh / A.A. Bannikova // Zhurn. Obshchey biologii. – 2004. – Т. 65. – S. 278–305.

3. Maniatis T. Molekulyarnoye klonirovaniye / T.Maniatis., E.Frich., D.Sembruk - Moskva: Mir, 1984. – 479 s.
4. Matveyeva T.V., Molekulyarnyye markery dlya vidoidentifikatsii i filogenetiki rasteniy / T.V. Matveyeva, O.A. Pavlova, D.I. Bogomaz // Ekol. genetika. - 2011. – T. 9. – S. . 32–43.
5. Karpishchenko A.I. Meditsinskiye laboratornyye tekhnologii. Spravochnik / A.I.Karpishchenko. - Sankt-Peterburg: Intermedika – 2002. – T. 2. – 600 s.
6. Metlits'ka O.Í. Metodichni í prikladní osoblivostí vikoristannya ISSR-PCR markuvann vnutrishn'o- i mízhporodnoí mínlivostí sviney / O.Í. Metlits'ka // Mízhvídomchiy tematichiy naukov. zbírnik «Rozvedennyya í genetika tvarin». – 2008.- T. 42. – S. 187-197.
7. Serebrovskiy A.S. Geneticheskiy analiz / A.S. Serebrovskiy. – M: Nauka, 1970. – 342 с.
8. Smaragdov M.G. Total'naya genomnaya selektsiya s pomoshch'yu SNP kak vozmozhnyy uskoritel' traditsionnykh selektsii / M.G. Smaragdov // Genetika.- 2009. – T. 45. – S. 725–728.
9. Sulimova G.Ye. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya / G.Ye. Sulimova // Usp. sovrem. biologii. – 2004. – T. 1214. – S. 260–271.
10. Khlestkina Ye.K. Molekulyarnyye metody analiza strukturno-funktsional'noy organizatsii genov i genomov vysshikh rasteniy / Ye.K. Khlestkina // Vavilov. zhurn. genet. i selektsii. – 2011. - T. 15(4). – S. 757–768.
11. Buckley T.R. Phylogenetic analysis of New Zealand earthworms (Oligochaeta: Megascolecidae) reveals ancient clades and cryptic taxonomic diversity. / T.R. Buckley, S. James, J. Allwood //Mol. Phylogenet. Evol. – j2011. – T. 58. – P. 85-96.
12. Decaëns T. Potentia of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology / T. Decaëns, D. Porco, R. Rougerie // Appl. Soil Ecol. – 2013. – T. 65 (35-42) <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.001>
13. Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication / J. Diamond // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 700–707.
14. Perez-Losada M. Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes / M. Perez-Losada, R. Bloch, J.W. Breinholt // Eur. J. Soil Biol. – 2012. – T. 48. – P. 41-47.
15. Rogstad S. Rogstad S.GELSTATS: acomputerprogram for population genetics analyses using VNTR multilocusprobedata / S. Rogstad, S. Pelican // BioTechniques. – 1996. – V. 21 (6). – P. 187-196.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ISSR-АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИННЕ-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП КУЛЬТУРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРВЕЙ РОДА *EISENIA*

Е. И. Тимчий, Е. И. Метлицкая, С. М Коренной, В. Т. Сметанин

Аннотация. Известно, что молекулярно-генетические методы способны обеспечить исследователей новыми и более точными средствами для разграничения видов дождевых червей и установления филогенетических расстояний между ними.

Исследовали, применяя нейтральные молекулярные маркеры, ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) внутренне-генетический полиморфизм дождевых червей рода *Eisenia* из массива вермикультуры кафедры биотехнологии, которые были облучены лазером типа ЛГН-2086 по

разным экспозициям во времени и культивировались на различных органических субстратах.

Применение метода ISSR-ПЦР заключается в использовании микросателлитных локусов как участков обжига праймеров, комплементарных микросателлитным повторам. Такие праймеры дают возможность амплификации фрагментов ДНК, которые расположены между микросателлитными последовательностями. Полученные паттерны являются видоспецифичными.

Исследования показали, что линия животных имеет достаточно высокий уровень гетерогенности, несмотря на то, что происходит от шести особей одного массива. Именно действие лазерного облучения и жесткий субстрат выращивания (донные залежи) оказались мощными факторами селективного давления.

Ключевые слова: генетическая изменчивость, молекулярные маркеры, микросателлитные локусы

USE OF ISSR ANALYSIS FOR STUDYING THE INTRANAL-GENETIC POLYMORPHISM OF DIFFERENT GROUPS OF CULTURAL POPULATION OF WILDS OF THE GENUS *EISENIA* WORMS

K. I. Timchy, E. I. Metlitskaya, S. M. Korennay, V. T. Smetanin

Abstract. *It is known that molecular genetic methods can provide researchers with new and more accurate means for distinguishing between types of earthworms and establishing phylogenetic distances between them.*

Using neutral molecular markers, ISSR (Inter-SimpleSequenceRepeat), internal genetic genetic polymorphism of earthworms of the genus Eisenia was studied from the mass of the vermiculture of the biotechnology department, which were irradiated with a laser of the LGH-208b type at different exposures over time and cultivated on various organic substrates.

The application of the ISSR-PCR method is the use of microsatellite loci as areas for firing primers that are complementary to microsatellite repeats. Such primers allow the amplification of DNA fragments that are located between the microsatellite sequences. The resulting patterns are species specific.

Studies have shown that the animal line has a fairly high degree of heterogeneity, despite the fact that it occurs from six individuals of the same massif, it is the effect of laser irradiation and the hard growing substrate (bottom deposits) that have proved to be powerful selective pressure factors.

Keywords: *genetic variability, molecular markers, microsatellite loci*