

Сергей Дромашко

Оксана Конева

заведующий лабораторией моделирования генетических процессов
Института генетики и цитологии НАН Беларуси,
доктор биологических наук

младший научный сотрудник Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Генетическая паспортизация пород белорусского карпа

УДК 577.21:597.551.2

Геномная регистрация живых организмов приобретает все большую актуальность. Активно идет разработка методов генотипирования растений и животных, ценных как с экологической, так и с сельскохозяйственной точки зрения. Осуществляются попытки создания генетических паспортов для различных биологических объектов. Масштабность и важность данной тенденции иллюстрируется также тем, что во многих странах уже введены законы, протоколирующие и регулирующие этот процесс (например, Закон «О государственной геномной регистрации в РФ» от 03.12.2008 г.) [1].

Ценность генетического типирования состоит в том, что оно позволяет достоверно определить таксономическую принадлежность организмов вплоть до уровня популяции, штамма; оценить уровень полиморфизма, его изменение, что важно для разработки мероприятий по сохранению биоразнообразия в дикой природе [2, 3]. В случае паспортизации сельскохозяйственных видов животных оно также дает возможность точно идентифицировать породу, что имеет огромное экономическое значение. Яркий пример эффективного использования такой паспортизации — работа российских генетиков, позволившая выявить подлог

с ропшинским карпом. Среди рыбоводов эта порода завоевала популярность своей зимостойкостью, неприхотливостью и плодовитостью, хорошими вкусовыми качествами. Для выращивания рыб, как правило, вначале покупается сертифицированный материал — икра или мелкие мальки. На этом этапе некоторые нечестные продавцы пытаются обмануть покупателей, выдавая неизвестных мальков за ропшинского карпа и стараясь вместо одной породы продать другую, в частности менее зимостойкую. Выявить подлог в таком случае позволяет только генотипирование и последующее сравнение полученных данных с генетическим паспортом заявленной породы [4].

В области рыбоводства до сих пор в целях паспортизации породы в основном использовались биохимические маркеры (например, у карпа — определение полиморфизма генов по локусу трансферринов). В то же время с помощью методов ДНК-типирования (RAPD-маркеры и микросателлиты [5—8]) зарубежными исследователями в последние годы выявлена высокая геномная вариабельность некоторых европейских (Венгрия) и азиатских (Китай) пород карпа. В странах СНГ лишь в России проводились единичные исследования местных и европейских

пород этой рыбы методом мультилокусного геномного типирования [9].

Генетическое тестирование имеет пожизненную информационную ценность. Его необходимо осуществлять один раз. Результаты стабильны и не зависят от эпигенетических факторов.

Единого протокола для составления генетического паспорта индивидуума или породы не существует. Возможно, это связано с тем, что работы по данному вопросу начали проводить не так давно и объем сведений о геномах различных организмов находится на разном уровне. Для некоторых уже известна полная последовательность генома, для других собраны лишь частичные данные или их вообще нет.

Процесс определения генотипа индивидуума осуществляется с помощью биологических методов. К данным методам относятся ПЦР, ДНК-секвенирование, гибридизация, ДНК-микрочипы и др. [10].

На сегодняшний день генетическая паспортизация, как основа геномной регистрации ресурсных видов растений и животных, нуждается в более рациональных подходах, базирующихся на молекулярном маркировании геномов.

Для генетического типирования используются различные варианты молекулярных маркеров — RFLP (англ. Restriction Fragment Length Polymorphism — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), RAPD (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA — случайная амплификация полиморфной ДНК), AFLP (англ. Amplified Fragment Length Polymorphism — полиморфизм длин амплифицируемых фрагментов), ISSR (англ. Inter-Simple Sequence Repeat — участки генома между микросателлитными локусами), SSR или микросателлиты (англ. Simple Sequence Repeats — tandemные повторы) и др., каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [11].

Целью наших исследований была разработка технологии генетического паспорта белорусского карпа по результатам молекулярного маркирования как научно-методической основы геномной регистрации исследуемых пород для их идентификации, использования потенциала и оптимизации сохранения генофондов. Исследования проведены в рамках задания 4.4.7 «Оценить генетическое разнообразие и создать эколого-генетические и молекулярно-биологические паспорта карпа белорусской селекции» ГП «Биотехнология».

Объектом исследования являлись 2—3-годовалые особи лахвинской и тремлянской породных групп карпа (зеркальная и чешуйчатая отводки), выловленные в феврале — октябре 2009 г. в прудах рыбхозов «Ляхва» и «Тремля» соответственно. Выборка осуществлялась из товарной рыбы.

Для разработки генетического паспорта белорусского карпа в качестве молекулярных маркеров, позволяющих выявить высокий уровень полиморфизма ДНК и проанализировать большую часть генома карпа, были выбраны RAPD-маркеры. Данная технология недорогая и доступная для массового анализа. Метод не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для под-

бора праймеров. Это тем более важно, что данных по последовательности генома карпа у нас не имеется. Пока установлена только полная первичная последовательность митохондриального генома карпа и исследован полиморфизм его отдельных участков в азиатских и европейских популяциях [7—8, 12—13].

Для предварительного анализа были избраны 7 праймеров с целью выявить среди них эффективные, пригодные для идентификации изучаемых нами пород (табл. 1).

Выделение ДНК осуществлялось из замороженных в 96%-ном этаноле плавников карпа (10—13 особей каждой отводки) методом фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию и чистоту ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/Visible (Biochrom Ltd.), качество проверяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле (SeaKem® LE Agarose, LONZA).

Амплификацию проводили на амплификаторе MyCycler™ (BioRad). Ее продукты подвергали электрофоретическому разделению в 2%-ном агарозном геле в устройстве для горизонтального электрофореза Vagorhor 11 (Эстония). Гель окрашивали в водном растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 20 мин. Визуализацию геля осуществляли с помощью системы документирования гелей GelDoc XR (Bio-Rad, США). Полученные изображения обрабатывали с использованием программы Quantity One 4.4.

Статистическая обработка экспериментальных данных по генотипированию осуществлялась с применением программы Statistica 6.0.

В данной статье мы приводим только результаты, полученные по праймеру 21 (5'-GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT-3') — одному из наиболее эффективных, показавшему свою пригодность для идентификации исследуемых нами пород.

При проведении RAPD-анализа чешуйчатой и зеркальной отводок лахвинской породы карпа по праймеру №21 были получены 36 типов ампликонов, большинство из которых присутствовало у обеих отводок лахвинского карпа. Внимания заслуживает фрагмент в 525 п.о. (пар оснований) (присутствовал только у зеркальной отводки лахвинского карпа, у 2 образцов из 10) и фрагмент в 1821 п.о. (присутствовал только у чешуйчатой отводки лахвинского карпа, у 4 образцов из 10) (рис. 1), лишь эти ампликоны встречались в одной из отводок в количестве больше 1 на всю выборку.

Данные ампликоны при более детальном исследовании могут претендовать на роль молекулярно-генетических маркеров для идентификации зеркальной и чешуйчатой отводок лахвинского карпа. Также следует отметить значительные частотные отличия между двумя вышеупомянутыми отводками лахвинского карпа по ампликонам в 2066 и 895 п.о.: у чешуйчатой отводки ампликон в 2066 п.о. присутствовал у 40% исследуемых особей, в то время как у зеркальной от-

Таблица 1. Характеристика RAPD-праймеров, выбранных для анализа

Название праймера	Последовательность	Концентрация, мкМ
OpB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	13,7
OpE-06	5'-AAGACCCCTC-3'	14,5
OpF-05	5'-CCGAATCCC-3'	18,6
OpE-16	5'-GGTGACTGTG-3'	14,1
21	5'-GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT-3'	10
45	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	10
15/19	5'-GAGGGTGGCGGCTAG-3'	10

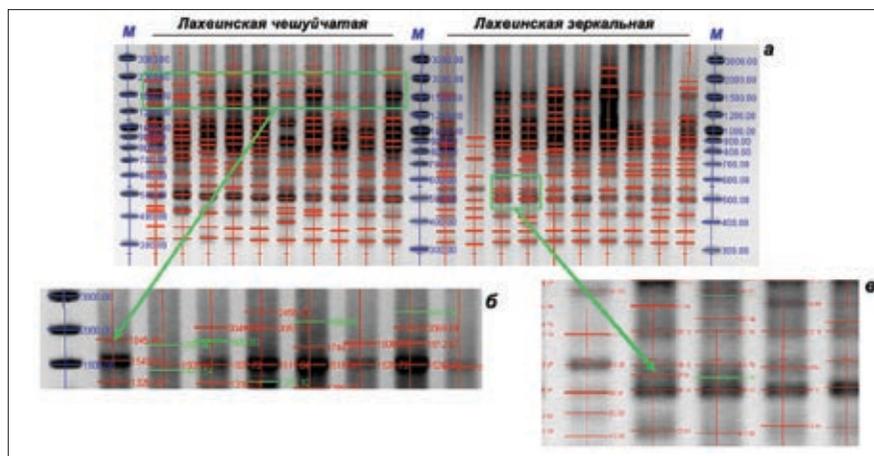


Рис. 1. Изображение геля с продуктами амплификации по праймеру №21 чешуйчатой и зеркальной отводок лахвинского карпа: а — полное изображение геля; б, в — увеличенные фрагменты выделенных на основном изображении геля участков, стрелки указывают на специфические для отводки ампликоны; М — маркер молекулярного веса GeneRuller™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

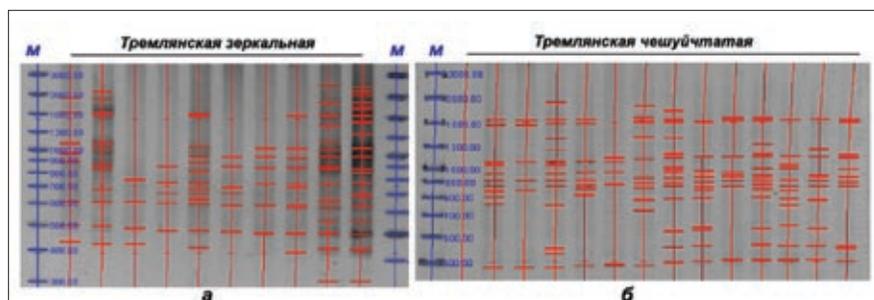


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с помощью праймера №21 для: а — зеркальной отводки тремлянского карпа, б — чешуйчатой отводки тремлянского карпа; М — маркер молекулярного веса GeneRuller™ 100bp Plus DNA Ladder

водки только у 10%. Ампликон 895 у чешуйчатой отводки встречался с частотой 40%, у зеркальной отводки — с частотой 70%. Возможно, данные различия также могут быть использованы в качестве дополнительных критериев идентификации отводок.

При сравнении спектра ампликонов по праймеру №21 лахвинской зеркальной и тремлянской зеркальной пород карпа получены следующие результаты: обнаружены различия по 15 типам ампликонов между этими двумя породами, однако внимания заслуживают только несколько из них. У особей лахвинской зеркальной породы присутствует ПЦР-

фрагмент в 922 п.о. (с частотой 40%), в то время как у тремлянской зеркальной (рис. 2) данный фрагмент отсутствует полностью. У нее обнаружены ампликоны в 1873 (с частотой 40%), 681 (с частотой 50%) и 615 п.о. (с частотой 70%). Данные ампликоны полностью отсутствуют у особой лахвинской зеркальной породы карпа.

Особое внимание следует уделить ампликону в 362 п.о., который на 100% присутствует в лахвинской зеркальной породе и на 100% отсутствует в тремлянской зеркальной породе карпа.

Сводный набор спектров и частот ампликонов по праймеру №21 лахвинской

зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянской зеркальной и тремлянской чешуйчатой пород карпа приводится в табл. 2. Из нее видно, что RAPD-анализ всех четырех пород карпа по праймеру №21 в сумме дал 50 типов ампликонов.

Среди полученных ампликонов для лахвинской зеркальной породы карпа оказался характерным (то есть не встречался ни у одного образца из выборок других пород) только один ампликон в 1703 п.о., который у анализируемой выборки из породы присутствовал с частотой 10%. Однако частота встречаемости низкая, так что этот ампликон не стоит рассматривать как возможный вариант молекулярного маркера для идентификации или паспортизации породы.

Для лахвинского чешуйчатого карпа характерными оказались три ампликона: 2190 (10%), 1923 (10%) и 1821 п.о. (40%). Среди них заслуживает внимания для дальнейшего рассмотрения в качестве возможного вспомогательного маркера характеристики породы ампликон в 1821 п.о., так как он присутствует в выборке с приемлемой частотой.

Для тремлянской зеркальной породы карпа являются характерными 5 ампликонов: 2226 (10%), 1679 (10%), 1538 (60%), 1364 (10%) и 681 п.о. (50%). Для характеристики породы пригодны только ампликоны 1538 и 681 п.о.

Для тремлянского чешуйчатого карпа специфическими оказались 6 ампликонов: 1571 (84,62%), 1098 (15,38%), 1040 (30,77%), 1002 (15,38%), 967 (53,85%) и 931 п.о. (53,85%). Для характеристики породы пригодны только ампликоны 931, 968 и 1040 п.о. Особое внимание следует уделить ампликону 1571, который позволяет идентифицировать породу практически на уровне единичной особи.

Специфическими для тремлянской породы карпа (то есть присутствуют у особей данной породы обеих отводок, и полностью отсутствуют у особей лахвинской породы обеих отводок) являются три ам-

Таблица 2. Сравнение спектров и частот ампликонов по праймеру №21 лахвинской зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянкой зеркальной и тремлянкой чешуйчатой пород карпа

Ампликоны, пар оснований				Процент ампликонов в выборке по локусу			
лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп	лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп
2446±4,22	2446±4,22	2462±23,00		10,00%	30,00%	20%	
		2226				10%	
	2190				10,00%		
2066±6,39	2066±6,39	2105±25,16	1946	10,00%	40,00%	20%	7,69%
	1923				10,00%		
		1873±12,23	1882			40%	7,69%
	1821±8,55				40,00%		
1736±13,83	1736±13,83	1737	1795	20,00%	20,00%	10%	7,69%
	1703			10,00%			
		1679				10%	
			1571±3,45				84,62%
		1538±3,84				60%	
1517±3,04	1517±3,04			90,00%	100,00%		
		1495±0,98	1508±3,93			20%	76,92%
	1443	1430			10,00%	10%	
		1364				10%	
1330±4,78	1330±4,78			20,00%	30,00%		
1299±5,05	1299±5,05		1302±3,52	20,00%	30,00%		23,08%
	1229	1243		10,00%		10%	
1188±1,58	1188±1,58		1176±18,61	10,00%	20,00%		23,08%
1144±2,91	1144±2,91	1144		30,00%	40,00%	10%	
			1098±10,36				15,38%
1071±1,57	1071±1,57	1061±3,68	1062±1,60	80,00%	100,00%	1061±3,68	100,00%
			1040±3,70				30,77%
			1002±1,13				15,38%
979±1,33	979±1,33	974±4,43	987±1,66	90,00%	90,00%	80%	30,77%
			967±2,11				53,85%
			931±2,35				53,85%
922±2,85	922±2,85		910±1,34	40,00%	40,00%		92,31%
895±1,98	895±1,98	896±3,53	890±1,64	70,00%	40,00%	30%	61,54%
866±2,81	866±2,81	874±1,44	870±3,50	50,00%	70,00%	70%	46,15%
844±2,17	844±2,17	840±4,18	850±3,31	60,00%	40,00%	30%	30,77%
814±3,55	814±3,55		797±3,78	10,00%	20,00%		61,54%
770±1,99	770±1,99	770±6,87		90,00%	90,00%	20%	
	748	754±2,30	756±3,07	10,00%		50%	23,08%
739±1,53	739±1,53	728±5,11		30,00%	10,00%	20%	
719±5,07	719±5,07		721	10,00%	10,00%		7,69%
695±1,25	695±1,25	698±3,05		80,00%	70,00%	20%	
		681±2,11				50%	
651±1,58	651±1,58	650±5,81		70,00%	60,00%	20%	
622±0,87	622±0,87	623±1,62	630±2,92	100,00%	100,00%	40%	15,38%
		615±1,06	615±1,89			70%	30,77%
547±1,07	547±1,07	552±2,08	542±1,52	100,00%	100,00%	20%	53,85%
525±2,44			529±0,62	20,00%			15,38%
496±0,93	496±0,93	495±1,54	482±0,75	100,00%	100,00%	100%	100,00%
442±2,92	442±2,92	433±1,18		50,00%	30,00%	50%	
422±1,07	422±1,07	422±3,55		80,00%	100,00%	20%	
390±3,46	390±3,46			10,00%	10,00%		
362±0,62	362±0,62			100,00%	90,00%		
324±0,75	324±0,75	327±1,51		100,00%	100,00%	20%	

- — ПЦР-фрагмент присутствует у одной из пород с частотой выше 50%;
- — ПЦР-фрагмент присутствует у одной из пород с частотой до 50% включительно;
- — ПЦР-фрагмент присутствует у всех исследованных особей обеих пород без исключения;
- — ПЦР-фрагмент присутствует либо у большинства исследованных особей обеих пород с их отводками, либо у одной из пород, но с низкой частотой.

пликона: 1873 п.о. (встречался у 40% анализируемых особей зеркальной отводки и у 7,69% особей чешуйчатой отводки), 1495 п.о. (у 20% анализируемых особей зеркальной и у 76,92% особей чешуйчатой отводки), 615 п.о. (у 70% анализируемых особей зеркальной и у 30,77% особей чешуйчатой отводки). Все данные ампликоны могут использоваться для характеристики породы.

Специфическими для ляхвинской породы карпа оказались 4 ампликона: 1517 п.о. (встречался у 90% анализируемых особей зеркальной и у 100% особей чешуйчатой отводки), 1330 п.о. (у 20% анализируемых особей зеркальной и у 30% особей чешуйчатой отводки), 390 п.о. (у 10% анализируемых особей зеркальной и у 10% особей чешуйчатой отводки), 362 п.о. (у 100% особей зеркальной и у 90% особей чешуйчатой отводки). Пригодными для характеристики породы являются только ампликоны 1517, 1330 и 362. Следует обратить особое внимание на маркеры 1517 и 362, которые в 100% присутствовали у особей данной породы обеих отводок, так как они могут оказаться молекулярными маркерами, позволяющими идентифицировать породу на уровне единичной особи.

Также был выявлен ампликон, характерный только для зеркальной отводки обеих пород: 1229 п.о. (у исследуемых особей ляхвинской породы он встречался с частотой 10%, у особей тремлянкой породы — с частотой 10%). Однако для характеристики зеркальной отводки карпа он не пригоден, так как частота встречаемости низкая или требуется проведение дополнительных исследований на более обширном материале.

Таким образом, в результате данных исследований впервые для карпа белорусской селекции выявлены ампликоны, которые могут быть использованы для характеристики породы. В генетический паспорт породы мы предлагаем включить следующую информацию: метод генетического типирования; праймер (название,

последовательность), дающий эффективные ампликоны для идентификации породы; молекулярный вес ПЦП-фрагмента, являющегося генетическим маркером породы (в парах оснований); изображение геля продуктов амплификации по данному праймеру с обозначением участков, содержащих молекулярные маркеры породы (для упрощения сравнения результатов при тестировании других особей).

Если всю вышеупомянутую информацию представить в виде математической формулы, получим следующее выражение:

$$\text{RAPD} - 1517_{\text{N21}} \text{ или } \text{RAPD} - \text{N21}_{1517}$$

Литература

1. Федеральный закон Российской Федерации от 03.12.2008 г. №242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» // Собрание законодательства Российской Федерации от 08.12.2008 г. №49. С. 5740.
2. Слуквин А.М., Конева О.Ю., Лесюк М.И. Генетическая идентификация стерляди (*Acipenser ruthenus L.*), выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области, по микросателлитным маркерам // Молекулярная и прикладная генетика. 2009. Т. 9. С. 146—152.
3. Тимошкина Н.Н. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) / Н.Н. Тимошкина и др. // Генетика. 2009. Т. 45. №9. С. 1250—1259.
4. Российские генетики раскрывают подлог с карпом // Электронное издание «Наука и технологии России STRF.ru». 8 сентября 2009. — [http://strf.ru/science.aspx?CatalogId=393&d_no=23514] — 25.02.2010.
5. Barfai R. Genetic analysis of two carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. / R. Barfai, S. Egedi, G. Hua Yue et al. // Aquaculture. — 2003. Vol. 219. P. 157—167.
6. Barman H. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. / H. Barman et al. // Aquaculture. 2003. Vol. 217. P. 115—123.
7. Zhou J. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio L.*) in China using microsatellite markers. / J. Zhou, Q. Wu, Z. Wang, Y. Ye // Rus. J. Genetics. 2004. Vol. 40, №10. P. 1144—1148.
8. Kohlmann K. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio L.*) populations through

the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers / K. Kohlmann et al. // Aquat. Living Resour. 2003. Vol. 16. P. 421—431.

9. Луданный Р.И. Генетическое разнообразие и дифференциация отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio L.*), выявляемая с помощью RAPD-маркеров. / Р.И. Луданный и др. // Генетика. 2006. Т. 42, №8. С. 1121—1129.

10. [http://en.wikipedia.org/wiki/Genotyping] — 25.02.2010.

11. Бронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов / Аграрный вестник Урала. №2 (56), 2009. С. 57—59.

12. Chang Y. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio L.*) mitochondrial genome. / Y. Chang, F. Huang, T. Lo // J. Mol. Evol. 1994. Vol. 38. P. 138—155.

13. Gross R. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio L.*). / R. Gross et al. // Aquaculture. 2002. Vol. 204. P. 507—516.

Summary

The article deals with results of typing for carp (*Cyprinus carpio L.*) breeding. The study is fulfilled for the first time in the country. Amplicons which can be used for characteristics of «lakhvinsky» and «tremljansky» races are revealed.