ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 1 2011 СЕРЫЯ АГРАРНЫХ НАВУК

УДК 639.371.52:577.21

О. Ю. КОНЕВА, С. Е. ДРОМАШКО

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ЛАХВИНСКОЙ И ТРЕМЛЯНСКОЙ ПОРОДНЫХ ГРУПП КАРПА (*CYPRINUS CARPIO* L.) МЕТОДОМ RAPD-АНАЛИЗА

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 27.07.2010)

В настоящее время неуклонно растет число данных по генотипированию различных видов животных, растений и бактерий. Этот процесс обеспечивает возможность молекулярно-генетической паспортизации ценных пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов.

В области рыбоводства в целях паспортизации породы в основном использовались генетикобиохимические маркеры (например, у карпа – определение полиморфизма генов по локусу трансферринов). В то же время методом ДНК-типирования пород карпа зарубежными исследователями в последние годы выявлена высокая геномная вариабельность некоторых европейских (Венгрия) и азиатских (Китай) пород с использованием таких молекулярных маркеров, как RAPD-маркеры и микросателлиты [1–4]. Установлена также полная первичная последовательность митохондриального генома карпа и исследован полиморфизм его отдельных участков в азиатских и европейских популяциях [3–6].

В странах СНГ лишь в России проводились единичные исследования местных и европейских пород карпа методом мультилокусного геномного типирования (англ. RAPD-PCR — произвольно амплифицированная методом полимеразной цепной реакции полиморфная ДНК). В частности, учеными лаборатории организации генома Института биологии гена РАН предложена простая в освоении технология, которая позволяет не только паспортизировать всех рыб, но и определить степень стабилизации породы [7]. Так, в работе Р. И. Луданного и соавт. при использовании четырех праймеров получены оценки генетического разнообразия в 12 популяциях и линиях семи российских пород карпа, европейского венгерского карпа и амурского сазана [8]. Наибольшее число полиморфных локусов зарегистрировано у ангелинских карпов, а также в выборках алтайского карпа и амурского сазана (P = 23,8-18,7%), а наименьшее (12,8%) — в линии ВВ ропшинского карпа.

Цель данной работы – проведение мультилокусного геномного типирования (RAPD-PCR) для породных групп карпа белорусской селекции.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись 2–3-годовалые особи лахвинской и тремлянской породных групп карпа (зеркальная и чешуйчатая отводки, товарная рыба), выловленные в феврале—октябре 2009 г. в ОАО «Рыбхоз «Лахва» и ОАО «Рыбхоз «Тремля» соответственно.

ДНК выделяли из законсервированных в 96%-ном этаноле плавников карпа (10–13 особей каждой отводки) в соответствии с методикой, описанной в работах [9–10].

Вначале образцы отмывали от спирта дистиллированной водой. Затем кусочек плавника, приблизительно 5 мм 2 , измельчали ножницами, помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, и добавляли 500 мкл лизирующего буфера (10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 10 мМ Na $_2$ ЭДТА, pH = 8,0; 50 мМ NaCl; 2% SDS), 30 мкл протеиназы К (20 мг/мл), 30 мкл 1 М ДТТ. Образцы помещали в термостат на ночь при 37 °C.

Далее к лизату добавляли фенолхлороформную смесь, центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин, водную фазу переносили в чистую пробирку (повторяли дважды). Для более полной очистки ДНК к супернатанту добавляли хлороформ, центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 8 мин, водную фазу переносили в чистую пробирку (перед экстракцией ДНК фенолхлороформной смесью в пробирки добавляли 3 М ацетат натрия (рН = 7,5) до концентрации 0,3 М с целью уменьшения потерь ДНК во время фенольной экстракции).

ДНК осаждали охлажденным до -20 °C 96%-ным этанолом, центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин. Осадок промывали 70%-ным этанолом, центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин. Далее осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 50—100 мкл дистиллированной воды.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/Visible (Biochrom Ltd.).

Качество выделенной ДНК проверяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле (SeaKem® LE Agarose, LONZA).

Для оценки уровня полиморфизма между лахвинской и тремлянской породными группами карпа (зеркальная и чешуйчатая отводки) и выявления специфических для породы молекулярных маркеров использовали RAPD-анализ по Р. И. Луданному и соавт. [8] и В. С. Артамонову [11].

ПЦР-смесь (25 мкл) содержала 2,5 мкл 10x ПЦР-буфер (Fermentas); 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2,5 мкл 10x d'NTP-mix (Праймтех); 1 мкл праймера (\approx 10 пкмоль/мкл); \approx 0,15 мкл ДНК-полимеразы (5 и/мкл) (Fermentas); 1 мкл ДНК-матрицы (\approx 300–1000 мкг/мл) и деионизированную воду до общего объема 25 мкл.

В отличие от исследований Р. И. Луданного [8], в которых использовались 4 праймера (OPAI1, OPAI7, R45, P29), мы для проведения RAPD-анализа случайным образом выбрали 7 праймеров (табл. 1).

Название праймера	Последовательность	Концентрация, мкМ	
OpB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	13,7	
OpE-06	5'-AAGACCCCTC-3'	14,5	
OpF-05	5'-CCGAATTCCC-3'	18,6	
OpE-16	5'-GGTGACTGTG-3'	14,1	
21	5'-GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT-3'	10,0	
45	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	10,0	
15/19	5'-GAGGGTGGCGGCTAG-3'	10,0	

Таблица 1. Характеристика RAPD-праймеров, выбранных для анализа

Амплификацию проводили на амплификаторе MyCyclerTM (BioRad, CША).

Продукты амплификации подвергали электрофоретическому разделению в 2%-ном агарозном геле в устройстве для горизонтального электрофореза Vagophor 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 (BioRad, CШA). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One 4.4.

Статистическую обработку экспериментальных данных по генотипированию осуществляли с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены результаты RAPD-PCR чешуйчатой и зеркальной отводок лахвинской породы карпа по праймеру № 21. В увеличенном варианте на данном рисунке представлены участки изображения геля с выявленными молекулярными маркерами: ампликон в 525 пар оснований (п. о.) (присутствовал только у зеркальной отводки лахвинского карпа, у 2 образцов из 10) и ампликон в 1821 п. о. (присутствовал только у чешуйчатой отводки лахвинского карпа, у 4 образцов из 10), которые встречались у одной из отводок и отсутствовали во второй.

На рис. 2 представлено изображение геля с продуктами амплификации по праймеру OpE-06 тремлянского зеркального и лахвинского зеркального карпа. Именно такие изображения анализировались нами в ходе работы.

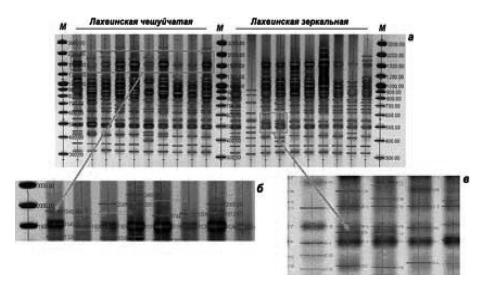


Рис. 1. Изображение геля с продуктами амплификации по праймеру № 21 чешуйчатой и зеркальной отводок лахвинского карпа: a — полное изображение геля; δ , ϵ — увеличенные фрагменты выделенных на основном изображении геля участков (стрелки указывают на специфические для отводки ампликоны); M — маркер молекулярного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

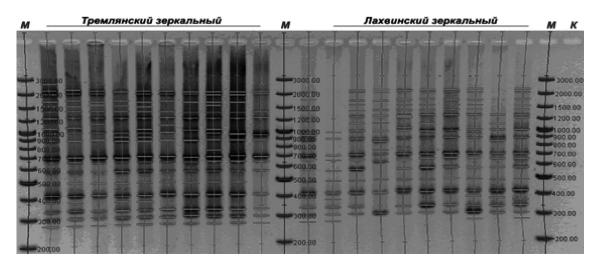


Рис. 2. Изображение геля с продуктами амплификации по праймеру OpE-06 тремлянского зеркального и лахвинского зеркального карпа; K – контроль, M – маркер молекулярного веса GeneRullerTM 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

Сводные результаты по ампликонам, полученным для праймеров № 21 и OpF-05, приведены в табл. 2.

Среди полученных ампликонов по праймеру № 21 для лахвинской зеркальной породы карпа оказался характерным (т. е. 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, поэтому этот ампликон не стоит рассматривать в качестве возможного варианта молекулярного маркера для идентификации или паспортизации породы. Для лахвинского чешуйчатого карпа характерными по полученным на данный момент результатам являются три ампликона: 2190 п. о. (10%), 1923 п. о. (10%), 1821 п. о. (40%). Среди них заслуживает внимания для дальнейшего рассмотрения в качестве возможного вспомогательного маркера породы ампликон 1821 п. о., так как он присутствует в выборке с приемлемой частотой.

Для тремлянской зеркальной породы карпа по праймеру № 21 являются характерными пять ампликонов: 2226 п. о. (10)%, 1679 п. о. (10%), 1538 п. о. (60%), 1364 п. о. (10%), 681 п. о. (50%). Для характеристики отводки породы пригодны только ампликоны 1538 п. о. и 681 п. о. Для тремлянского

Таблица 2. Сравнение спектров и частот ампликонов по праймерам № 21 и OpF-05 лахвинской зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянской зеркальной и тремлянской чешуйчатой пород карпа

	Ампликоны, пар оснований				Процент ампликонов в выборке по локусу			
Тип праймера	лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп	лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп
	2066±6,39 ⁵	2066±6,39 ⁵	2105±25,16 ⁵	1946 ⁵	10,00	40,00	20	7,69
			1873±12,23 ²	1882 ²	,	,	40	7,69
		1821±8,55 ⁵	, , ,			40,00	-	.,
	1736±13,83 ⁵	1736±13,83 ⁵	1737 ⁵	1795 ⁵	20,00	20,00	10	7,69
	1703 ⁵				10,00			
			1679 ⁵				10	
				1571±3,45 ¹				84,62
			1538±3,84 ¹				60	
	1517±3,04 ¹	1517±3,04 ¹			90,00	100,00		
			$1495\pm0,98^2$	$1508\pm3,93^2$			20	76,92
	$1330\pm4,78^2$	1330±4,78 ²			20,00	30,00		
	$1071\pm1,57^5$	1071±1,57 ⁵	1061±3,68 ⁵	1062±1,60 ⁵	80,00	100,00	70	100,00
				$1040\pm3,70^2$				30,77
				1002±1,13 ²				15,38
	979±1,33 ⁵	979±1,33 ⁵	974±4,43 ⁵	987±1,66 ⁵	90,00	90,00	80	30,77
				967±2,11 ¹				53,85
				931±2,35 ¹				53,85
№ 21	922±2,85 ⁵	922±2,85 ⁵		910±1,34 ⁵	40,00	40,00		92,31
	895±1,98 ⁵	895±1,98 ⁵	896±3,53 ⁵	890±1,64 ⁵	70,00	40,00	30	61,54
	866±2,81 ⁵	866±2,81 ⁵	874±1,44 ⁵	870±3,50 ⁵	50,00	70,00	70	46,15
	844±2,17 ⁵	844±2,17 ⁵	840±4,18 ⁵	850±3,31 ⁵	60,00	40,00	30	30,77
	814±3,55 ⁵	814±3,55 ⁵		797±3,78 ⁵	10,00	20,00		61,54
	$770\pm1,99^5$	770±1,99 ⁵	$770\pm6,87^{5}$		90,00	90,00	20	
	748 ⁵		$754\pm2,30^5$	756±3,07 ⁵	10,00		50	23,08
			$681\pm2,11^2$				50	
	651±1,58 ⁵	651±1,58 ⁵	650±5,81 ⁵		70,00	60,00	20	
	$622\pm0,87^{5}$	622±0,87 ⁵	623±1,62 ⁵	630±2,92 ⁵	100,00	100,00	40	15,38
			$615\pm1,06^2$	615±1,89 ²			70	30,77
	$547\pm1,07^5$	547±1,07 ⁵	$552\pm2,08^5$	542±1,52 ⁵	100,00	100,00	20	53,85
	$525\pm2,44^{5}$			529±0,62	20,00			15,38
	$496\pm0,93^3$	$496\pm0,93^3$	495±1,54 ³	$482\pm0,75^3$	100,00	100,00	100	100,00
	442±2,92 ⁵	442±2,92 ⁵	433±1,18 ⁵		50,00	30,00	50	
	$422\pm1,07^5$	422±1,07 ⁵	422±3,55 ⁵		80,00	100,00	20	
	390±3,46 ⁵	390±3,46 ⁵			10,00	10,00		
	$362\pm0,62^{1}$	362±0,62 ¹			100,00	90,00		
	$324\pm0,75^5$	$324\pm0,75^5$	327±1,51 ⁵		100,00	100,00	20	
		995±2,12 ⁴		972±6,22 ⁴		100,00		50,00
	728 ⁵	736 ⁵			10,00	10,00		
OpF-05		5045				10,00		
	$403\pm0,99^3$	399±0,51 ³	404±1,34 ³	399±1,25 ³	100,00	100,00	100,00	100,00
		326±1,34 ⁴		328±1,50 ⁴		30,00		57,14

¹ ПЦР-фрагмент присутствует у одной из пород с частотой выше 50%;

 $^{^2}$ ПЦР-фрагмент присутствует у одной из пород с частотой до 50% включительно;

³ ПЦР-фрагмент присутствует у всех исследованных особей обеих пород без исключения;

⁴ ПЦР-фрагмент присутствует либо только у зеркальной отводки обеих пород, либо только у чешуйчатой отводки обеих пород;

⁵ ПЦР-фрагмент присутствует либо у большинства исследованных особей обеих пород с их отводками, либо у одной из пород, но с низкой частотой. То же для табл. 3.

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

Специфическими для тремлянской породы карпа (т. е. присутствовали у особей данной породы обеих отводок и полностью отсутствовали у особей лахвинской породы обеих отводок) являются три ампликона: 1873 п. о. (встречался у 40% анализируемых особей зеркальной отводки и у 7,69% особей чешуйчатой отводки), 1495 п. о. (встречался у 20% анализируемых особей зеркальной отводки и у 76,92% особей чешуйчатой отводки), 615 п. о. (встречался у 70% анализируемых особей зеркальной отводки и у 30,77% особей чешуйчатой отводки). Все данные ампликоны могут использоваться для характеристики породы.

Специфическими для лахвинской породы карпа оказались четыре ампликона: 1517 п. о. (встречался у 90% анализируемых особей зеркальной отводки и у 100% особей чешуйчатой отводки), 1330 п. о. (встречался у 20% анализируемых особей зеркальной отводки и у 30% особей чешуйчатой отводки), 390 п. о. (встречался у 10% анализируемых особей зеркальной отводки и у 10% особей чешуйчатой отводки), 362 п. о. (встречался у 100% особей зеркальной отводки 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 практически 100% присутствовали у особей данной породы обеих отводок, поскольку 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 лахвинской и тремлянской пород он встречался с частотой 10%). Однако для характеристики зеркальной отводки карпа он не пригоден, так как частота встречаемости либо низкая, либо требуется проведение дополнительных исследований на более обширном материале.

По праймеру OpF-05 для лахвинской зеркальной отводки специфических ампликонов не обнаружено. Для лахвинской чешуйчатой отводки обнаружен специфический ампликон в 504 п. о., но частота встречаемости данного ПЦР-фрагмента в выборке крайне низкая (10%), поэтому он не пригоден в качестве молекулярного маркера отводки породы.

Для тремлянской зеркальной и тремлянской чешуйчатой отводок по праймеру OpF-05 специфических ампликонов не обнаружено.

В целом для лахвинской породы карпа был обнаружен специфический ампликон \approx 732 п. о., который встречался у обеих отводок лахвинской породы и полностью отсутствовал у отводок тремлянской породы, но частота встречаемости также оказалась низкая (10%), что делает его непригодным для использования в качестве маркера породы.

Для тремлянской породы по данному праймеру специфических ампликонов не выявлено.

По праймеру OpF-05 были обнаружены два ампликона (\approx 984 п. о. и \approx 327 п. о.), специфические только для чешуйчатых отводок обеих пород с достаточной высокой частотой встречаемости (см. табл. 2).

В табл. 3 представлены сводные результаты по ампликонам, характерным для праймеров N 15/19 и OpE-06.

По праймеру OpE-06 для тремлянской зеркальной отводки были выявлены специфические ампликоны 2524 п. о. и 1073 п. о.; для тремлянской чешуйчатой – 812 п. о., 782 п. о., 538 п. о., 417 п. о.

Для лахвинской зеркальной отводки специфическим по праймеру OpE-06 оказался ампликон 852 n. o.; для лахвинской чешуйчатой отводки -2304 n. o., 1607 n. o., 355 n. o., 249 n. o., 227 n. o.

Но все вышеперечисленные ампликоны встречались в выборках с низкой частотой, поэтому они не пригодны как молекулярные маркеры.

Было выявлено несколько ампликонов, характерных либо только для зеркальных отводок обеих пород, либо только для чешуйчатых, причем некоторые из них встречались с достаточно высокой частотой (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение спектров и частот ампликонов по праймерам № 15/19 и ОрЕ-06 лахвинской зеркальной, лахвинской чешуйчатой, тремлянской зеркальной и тремлянской чешуйчатой пород карпа

	Ампликоны, пар оснований				Процент ампликонов в выборке по локусу			
Тип праймера	лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп	лахвинский зеркальный карп	лахвинский чешуйчатый карп	тремлянский зеркальный карп	тремлянский чешуйчатый карп
№ 15/19	2796 ⁵				10,00			
			2047 ⁵				10,00	
	1772±5,97 ⁴		1772±5,76 ⁴		100,00		70,00	
		1605±9,33 ⁴		1695 ⁴		40,00		6,67
	1473±3,05 ³	$1479\pm6,27^3$	$1473\pm3,26^3$	1481±3,41 ³	100,00	100,00	100,00	100,00
				1367±10,51 ⁵				20,00
	952 ⁵				10,00			
	914±1,82 ³	922±2,15 ³	$919\pm1,95^{3}$	927±2,92 ³	100,00	100,00	100,00	100,00
			$2524\pm0,00^{5}$				30,00	
		23045				10,00		
	2215±8,26 ⁴		2201±3,75 ⁴		70,00		100,00	
		2034 ⁴		2018±9,51 ⁴		10,00		37,71
		1970±6,79 ⁴		1966±7,28 ⁴		90,00		50,00
		1806 ⁴		1800±13,05 ⁴		10,00		28,57
		1607±4,70 ⁵				30,00		
		1514±3,89 ⁴		1506±8,16 ⁴		40,00		14,29
			1073±1,12 ⁵				20,00	
	1045 ⁵	1055±6,55 ⁵	$1040\pm5,34^{5}$	1061±3,39 ⁵	10,00	40,00	30,00	73,43
OpE-06		977±5,51 ⁴		976±2,73 ⁴		60,00		50,00
	852±0,70 ⁵				20,00			
				812±7,01 ⁵				14,29
				787±2,84 ⁵				21,43
	701±1,09 ³	683±1,04 ³	$696\pm1,71^3$	679±1,28 ³	100,00	100,00	100,00	100,00
				538 ⁵				7,14
				417±1,70 ⁵			28,57	
		355 ⁵				10,00		
		337±0,35 ⁴		341±1,40 ⁴		40,00		57,14
		249 ⁵				10,00		
		227±0,33 ⁵				20,00		

В целом для лахвинской и тремплянской пород карпа по праймеру OpE-06 специфических ампликонов выявлено не было.

По праймеру 15/19 для лахвинской зеркальной породы оказались специфическими ампликоны 2796 п. о. и 952 п. о. Для лахвинской чешуйчатой специфических ПЦР-фрагментов выявлено не было.

Для тремлянской зеркальной породы по данному праймеру оказался характерным фрагмент 2047 п. о., для тремлянской чешуйчатой отводки – фрагмент 1367 п. о.

Но опять же все вышеперечисленные ампликоны встречались с низкой частотой в выборках карпа и являются непригодными для идентификации соответствующих отводок.

В целом для лахвинской и тремлянской пород специфических ампликонов по праймеру 15/19 обнаружено не было.

Несколько ампликонов были характерны либо только для зеркальной, либо только для чешуйчатой отводок исследуемых пород (см. табл. 3).

В генетический паспорт породы мы предлагаем включать следующую информацию:

- 1) используемый для генетического типирования метод;
- 2) праймер (название, последовательность), дающий эффективные ампликоны для идентификации породы;
 - 3) молекулярный вес ПЦР-фрагмента(-ов), являющегося генетическим маркером породы (п. о.);

4) изображение геля продуктов амплификации по данному праймеру с обозначением участков, содержащих молекулярные маркеры породы (для упрощения сравнения результатов при тестировании других особей).

Данную информацию можно представить в виде математической формулы

$$RAPD-1517_{N21}$$
 или $RAPD-N21_{1517}$,

где RAPD – метод, с помощью которого в данном случае производилось генотипирование (это могут быть также ISSR, SSR, AFLP и т. д.); N21 – сокращенное название праймера (или локуса), который использовался в генотипировании и оказался эффективным для идентификации породы, отводки и т. д.; 1517 – молекулярный вес (п. о.) ПЦР-фрагмента (ампликона), оказавшегося генетическим маркером породы по данному праймеру.

Также в генетический паспорт можно добавить информацию о частотных различиях по некоторым другим ампликонам у заявленной породы.

Таким образом, исследования показали, что приемлемой на данном этапе работы дифференцирующей способностью обладает только праймер № 21.

Выводы

- 1. В результате проведенных исследований впервые для карпа белорусской селекции выявлены праймеры и ампликоны по ним, которые могут использоваться для характеристики породы.
- 2. Наилучшие результаты показал праймер № 21. Специфическими для тремлянской породы карпа при генотипировании по этому праймеру оказались три ампликона: 1873 п. о., 1495 и 615 п. о., которые могут использоваться для характеристики породы. Для лахвинской породы карпа специфическими по праймеру № 21 оказались четыре ампликона: 1517 п. о., 1330 п. о., 390 п. о. и 362 п. о. Пригодными для характеристики породы являются только ампликоны 1517 п. о., 1330 п. о. и 362 п. о. При этом фрагменты 1517 п. о. и 362 п. о. присутствовали практически у всех особей данной породы обеих отводок, т. е. их использование в качестве молекулярных маркеров, возможно, позволит идентифицировать породу на уровне единичной особи.
- 3. Разработана схема генетического паспорта породы, включающая: 1) используемый для генетического типирования метод; 2) праймер (название, последовательность), дающий эффективные ампликоны для идентификации породы; 3) молекулярный вес ПЦР-фрагмента(-ов), являющегося генетическим маркером породы (п. о.); 4) изображение геля продуктов амплификации по данному праймеру с обозначением участков, содержащих молекулярные маркеры породы.
- 4. Формула паспорта для лахвинского карпа: RAPD-N21 $_{1517}$ N21 $_{1330}$ N21 $_{362}$; для тремлянского карпа: RAPD-N21 $_{1873}$ N21 $_{1495}$ N21 $_{615}$. Для большинства отдельных отводок дать однозначную молекулярно-генетическую характеристику на основе RAPD-анализа пока не представляется возможным, однако, возможна дифференциация чешуйчатой и зеркальной отводок с помощью отдельных ампликонов по праймерам № 15/19, OpE-06.

Работа выполнена в рамках задания 4.4.7 «Оценить генетическое разнообразие и создать эколого-генетические и молекулярно-биологические паспорта карпа белорусской селекции» ГП «Биотехнология».

Литература

- 1. Genetic analysis of two carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers / R. Bartfai [et al.] // Aquaculture. -2003. Vol. 219. P. 157–167.
- 2. 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.
- 3. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers / J. Zhou [et al.] // Rus. J. Genetics. 2004. Vol. 40, N 10. P. 1144–1148.
- 4. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinys carpio* L.) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitohondrial DNA markers / K. Kohlmann [et al.] // Aquat. Living Resour. 2003. Vol. 16. P. 421–431.

- 5. C h a n g, 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.
- 6. G r o s s, R. PCR-RFLP analysis of the mitohondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. Gross, K. Kolhmann, P. Kersten // Aquaculture. 2002. Vol. 204. P. 507–516.
- 7. Российские генетики раскрывают подлог с карпом [Электронный ресурс] / Электронное издание «Наука и технологии России STRF.ru».— 08.09.2009. Режим доступа: http://strf.ru/science.aspx?CatalogId=393&d_no=23514. Дата доступа: 19.05.2010.
- 8. 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.
- 9. С л у к в и н, А. М. Генетическая идентификация стерляди (*Acipenser ruthenus* L.), выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Пинского района Брестской области по микросателлитным маркерам / А. М. Слуквин, О. Ю. Конева, М. И. Лесюк // Молекулярная и прикладная генетика. 2009. Т. 9. С. 146–152.
- 10. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) / Н. Н. Тимошкина [и др.] // Генетика. 2009. Т. 45. № 9. С. 1250–1259.
- 11. А р т а м о н о в а, В. С. Генетические маркеры в популяционных исследованиях атлантического лосося (Salmo salar L.). II. Анализ последовательностей ДНК / В. С. Артамонова // Генетика. -2007. Т. 43. № 4. С. 437–450.

O. Yu. KONEVA, S. E. DROMASHKO

MOLECULAR AND GENETIC CERTIFICATION OF "LAKHVINSKY" AND "TREMLYANSKY" RACE GROUPS OF CARP (CYPRINUS CARPIO L.) ACCORDING TO THE METHOD OF RAPD-ANALYSIS

Summary

The paper presents the results of DNA typing of carp of the Belarusian breeding to have been carried out for the first time in the country. Primers and amplicons suitable for molecular and genetic characteristics of "lakhvinsky" and "tremlyansky" race groups are identified, a formula for a carp certification is proposed.