

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ИНТЕНСИВНОГО РАЗВИТИЯ
ЖИВОТНОВОДСТВА**

Сборник научных трудов

Выпуск 19

В двух частях

Часть 1

Горки
БГСХА
2016

УДК 631.151.2:636
ББК 65.325.2
А43

Редакционная коллегия:

Н. И. Гавриченко (гл. редактор), Г. Ф. Медведев (зам. гл. редактора),
Е. П. Савиц (редактор), О. Г. Цикунова (отв. секретарь, комп. набор и верстка),
Л. Н. Гамко, Н. И. Сахацкий, В. С. Авдеенко, Н. В. Подскребкин,
Н. А. Садошов, И. С. Серяков, А. В. Соляник, М. В. Шалак, А. И. Портной,
Т. В. Павлова, Н. В. Барулин.

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор Г. Ф. Медведев
доктор сельскохозяйственных наук, профессор И. С. Серяков
доктор сельскохозяйственных наук, доцент Н. И. Гавриченко
доктор сельскохозяйственных наук, доцент Н. В. Подскребкин
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент А. И. Портной

Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сборник
А43 научных трудов / гл. редактор Н. И. Гавриченко. – Горки: БГСХА, 2016. – Вып. 19. –
В 2 ч. – Ч. 1. – 368 с.

Представлены результаты исследований ученых Республики Беларусь, Российской Федерации, Украины, Латвии в области кормления, содержания, разведения, селекции и генетики животных, воспроизводства и биотехнологии, ветеринарной медицины, технологии производства, переработки и хранения продукции животноводства.

Посвящен 90-летию образования кафедр биотехнологии и ветеринарной медицины и кормления и разведения с.-х. животных УО БГСХА; 130-летию со дня рождения основателя зоотехнического образования и науки о кормлении с.-х. животных в Белоруссии, доктора с.-х. наук, профессора Николая Васильевича Найденкова и 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки Республики Беларусь, доктора биологических наук, профессора Юрия Леонидовича Максимова

УДК 631.151.2:636
ББК 65.325.2

© УО «Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2016

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НИВЧАНСКОГО ЧЕШУЙЧАСТОГО КАРПА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДНК МАРКЕРОВ (ISSR-PCR)

А. Э. МАРИУЦА

Институт рыбного хозяйства НААН Украины,
г. Киев, Украина, 03164

(Поступила в редакцию 11.01.2016)

Резюме. *ISSR-анализ позволил изучить генетическую изменчивость на популяционном уровне. Оптимизированный ISSR-метод может служить эффективным инструментом для дальнейших генетических исследований. Полученные результаты позволят контролировать селекционно-племенную работу в процессе воспроизводства генофонда популяций рыб. Для повышения эффективности селекционно-племенной работы в рыбоводстве целесообразно использовать генетические маркеры, имеющие высокую специфичность к отдельным фрагментам ДНК рыб.*

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, ДНК-маркеры, нивчанский чешуйчатый карп, генотип, ампликон.

Summary. *ISSR-analysis allowed to study the genetic variability at the population level. Specific «population» polymorphic ISSR-markers identified during our investigations allow to use this information in further studies for development genetic certification using modern techniques. ISSR-analysis optimized method can serve as an effective instrument for further genetic researches of carp population. Got results, allow to control breeding tribal work in the process of gene pool reproduction of the present fish populations. For the increase of breeding work efficiency in fisheries it is expedient the using of genetic markers that have high specificity to these separate fragments of fish DNA.*

Key words: molecular genetics methods, genetic structure, Nyvkan carp, DNA-markers, genotype, amplicon.

Введение. Получение значительного количества белка в питании человека обеспечивается за счет животноводческой продукции. Весомую долю составляет карповодство – одна из основных отраслей получения продукции рыбоводства во всем мире. Карп был получен путем селекции дикого вида сазана. В Европу одомашненный вид карпа попал с Дальнего Востока. На территории СНГ карп является наиболее распространенным видом. Селекция в карповодстве Украины ведется в направлении получения пород, внутривидовых типов и зональных массивов. Порода создается для определенной технологии разведения и выращивания.

Нивковские внутривидовые типы карпа созданы в 60–90-х годах на базе опытного хозяйства «Нивка» Института рыбного хозяйства методом вводного скрещивания чешуйчатых самок Антонинского-

зозуленецкого внутривидового типа карпов с самцами российской Ропшинской породной группы.

Чешуйчатые карпы выпасного типа хорошо приспособлены к условиям выращивания в больших русловых прудах, к потреблению природных кормов, особенно при экстенсивном ведении хозяйства [3].

Обогащенная наследственность нивковских карпов обеспечивает им более раннее созревание, высокую плодовитость, степень выживаемости и темп роста. По своим наследственными особенностями нивковские карпы характеризуются повышенной холодо- и зимостойкостью [4]. Очевидно, что разработка генетически обоснованных программ по сохранению, улучшению и рациональному использованию генофондов рыб невозможна без глубоких исследований особенностей их генетических структур. Такие исследования являются основой определения вероятности проявления того или иного состояния признака в будущих потомков.

Использование ДНК-маркеров – одно из перспективных направлений исследования генома, позволяет решать не только фундаментальные, но и практические задачи. Направление исследований нашли свое применение при изучении генофонда различных видов сельскохозяйственных животных и использования специфики их генотипов в селекционно-племенной работе [5, 6].

Выявление полиморфизма методом ISSR-PCR позволило установить определенную специфичность спектра ампликонов, в зависимости от исследуемого праймера. Выявленные последовательности ДНК могут быть частью так называемых геноспецифичных локусов, в свою очередь открывает перспективы для поиска корреляций с количественными и качественными признаками.

В селекционно-племенной области рыбоводства для установления особенностей генетической структуры групп рыб все чаще используют высокополиморфных молекулярно-генетические маркерные системы за использование ПЦР [7,8]. Популярность этих методов обусловлена, прежде всего, возможностью оценивания как межпородной, так и внутривидовой изменчивости исследуемых животных. Именно применение в исследованиях значительного количества маркеров при жестком отборе особей с уникальным сочетанием признаков является основным путем для изучения возможных взаимосвязей между различными морфофизиологическими системами на уровне ДНК [9].

Для ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные к микросателлитных повторов, которые имеют на одном из концов последовательность из 2–4 произвольных нуклеотидов. С помощью такого подхода можно амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя близко расположенными последовательностями,

которые считаются уникальными. В результате получают значительное количество видоспецифических ПЦР-продуктов, представленных дискретными полосами на электрофореграмме [10].

С целью изучения внутри породных особенностей генетической структуры, поиска генетических различий и выяснение возможного влияния на ее генетическую структуру условий разведения в работе выполнен сравнительный анализ распределения фрагментов ДНК в нивковского чешуйчатого карпа за использование ISSR-метода [11].

Материал и методика исследований. В исследованиях использовали особей Нивковского чешуйчатого карпа «Лебединской рыбоводно-мелиоративной станции», Сумской обл. Отобраны образцы крови из хвостовой вены в 10 особей качестве консерванта использовали гепарин из расчета 25 МЕ на 1 мл крови. Отобранную кровь фракционировали центрифугированием в течение 10 минут. Полученные фракции плазмы, лейкоцитов и эритроцитов фасовали в пробирки типа «Eppendorf», замораживали и хранили при температуре – 18° С. ДНК выделяли из эритроцитов с помощью набора реагентов «Gene JET Whole Genomik DNA Purification Mini Kit (США). В пробирки с лиофилизированной смесью, содержащей 1 ед. Taq-полимеразы, 200 мкм дезоксинуклеозидтрифосфатив, 2,5 ммоль MgCl₂, вносили 5 мкл (20нг) геномной ДНК, 5 мкл 0,2 мМ праймера, 10 мкл ПЦР-раствора. Для ПЦР использовали амплификатор «Mastercycler» (Eppendorf). Реакцию проводили в следующем режиме: первый этап – денатурация 2 мин. при 95° С; следующие 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 ° С, 30 с отжиг – при 58° С, синтез – 2 мин. – при 72° С.

Для исследования генетической структуры популяции карпа использовали три праймера (AGC)6G, (ACC)6G, (AGC)6C.

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидные последовательности праймеров

Праймер	Последовательности праймеров 5'-3'	Температура отжига праймера (°С)
(AGC)6G	AGCAGCAGC AGCAGCAGCG	58
(ACC)6G	ACCACC ACCACCACC ACCG	56
(AGC)6C	AGCAGCAGCAGCAGCAGCC	58

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза, который проводили в 2 %-м агарозном геле. Визуализацию фрагментов ДНК проводили в ультрафиолетовом излучении на трансиллюминаторе Caution (Франция) при использовании красителя бромистого этидия (0,5 мкг / мл геля) с фиксированием электрофореграмм цифровой ка-

мерой Canon EOS 450D (Япония). Определение генотипов образцов осуществляли при использовании маркера молекулярных масс 1-kb DNA Ladder (Gibco BRL) (Украина). Статистическая обработка и анализ данных гелей проводили при использовании программы TotalLab V2.01 [12].

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ полиморфизма и наследования аллельных вариантов анонимных последовательностей геномной ДНК по ряду микросателлитных праймеров проводился с использованием PCR-ISSR анализа. При выборе праймеров руководствовались тем фактором, что геном карпа содержит 9 % повторов типа GT и почти 3 % – AC (65000–100000 копий), повторяемость GA при этом составляет до 5000 копий на гаплоидный набор хромосом [13]. Исходя из химических свойств строения нуклеотидов пуриновых и пиримидиновых групп можно предположить большую часть мутационных событий пуригнасыщенных участков ДНК. Кроме этого, по данным других авторов, изучение полиморфизма отдельных локусов ДНК и расчета уровня гетерозиготности особей наиболее подходящими оказались локусы с высоким содержанием азотистых оснований группы пуринов- A + G, или пурип-пиримидиновых соединений A + C [14].

В популяции нивковского чешуйчатого карпа при использовании праймера (AGC)6G суммарно выявлено 35 ампликонов, размер которых находится в пределах 450–2500 п. н. Спектры насчитывали от двух до восьми ампликонов. По праймерам (AGC)6G в популяции обнаружено семь аллелей. Количество ампликонов длиной 450 п. н. 2500 п. н., составило 11,4 %. Количество ампликонов длиной 500 п. н. и 2000 п. н. составляло 5,7 %.

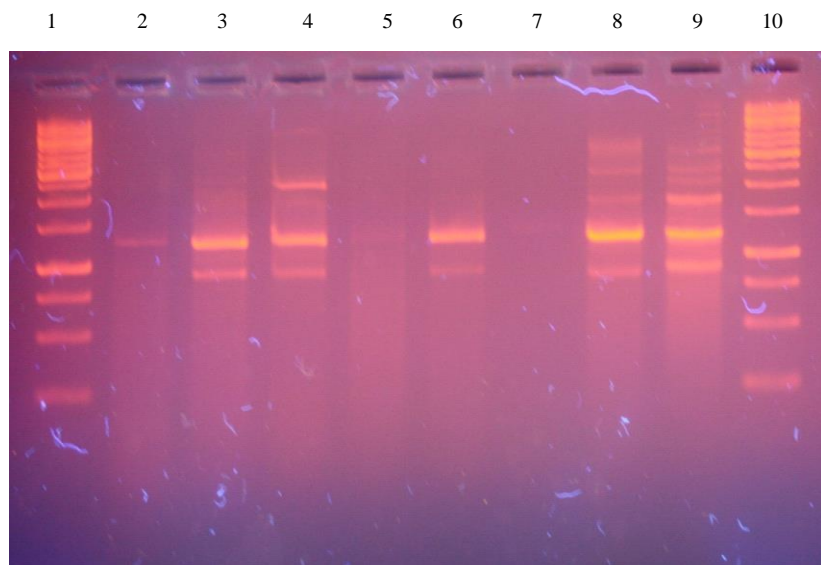
У исследованной группы по трем праймерам суммарно было выявлено всего 102 аллеля с молекулярной массой 300 п. н. – 3500 п. н. Число аллелей на локус варьировало от 7-ми до 13. Наиболее полиморфным был праймер (AGC)6C (выявлено 13 аллелей), а наименее полиморфным – праймер (AGC)6G (выявлено 7 аллелей) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Значения показателей генетического разнообразия исследованных рыб

Праймер	Количество аллелей	Молекулярная масса продукта (п. н.)	Эффективное число аллелей	H_{obs}	H_{exp}
(AGC)6G	7	450–2500	1,218	0,600	0,700
(ACC)6G	9	800–3500	1,220	0,650	0,786
(AGC)6C	13	300–2500	1,115	0,800	0,807
Среднее	9,7		1,184	0,68	0,764

Эффективное число аллелей (показатель, который характеризует локусы по частоте встречаемости аллелей) в исследуемой выборке генотипов варьировало от 1,115 (*AGC*)_{6C} до 1,220 (*ACC*)_{6G}. Среднее эффективное число аллелей на локус составило 1,184. По расчетам аллельных частот определены основные показатели генетической изменчивости. Максимальный уровень имеющейся гетерозиготности зафиксирован для локуса (*AGC*)_{6C}, самый низкий – для локуса (*AGC*)_{6G}.

При использовании праймера (*ACC*)_{6G} в популяции обнаружено девять аллелей. Количество ампликонов длиной 2000 п. н. 3500 п. н., составило 4,17 %. Количество ампликонов длиной 800 п. н., 1600 п. н. 2500 п. н. и 3000 п. н. составляло 8,3 %. Количество ампликонов длиной 1300 п. н. и 1400 п. н. составило 16,7 %. В популяции нивковского чешуйчатого карпа при использовании праймера (*ACC*)_{6G} суммарно выявлено 24 ампликона, размер которых находится в пределах 800–3500 п. н. Спектры насчитывали от одного до шести ампликонов (рисунк).



Р и с. Электрофоретичный спектр ампликонов нивковского чешуйчатого карпа (ISSR-PCR) полученный при использовании праймера (*ACC*)_{6G}, – дорожки № 2–9; № 1,10 – маркер молекулярной массы Gene Ruler 1kb DNA Ladder

В популяции нивковского чешуйчатого карпа при использовании праймера (*AGC*)_{6C} суммарно выявлено 43 ампликона, размер которых

находится в пределах 300–2500 п. н. Спектры насчитывали от одного до шести ампликонов. По праймером (AGC)6C в популяции выявлено 13 аллелей. Количество ампликонов длиной 300 п. н., 450 п. н., 1000 п. н., 2000 п. н. составляло 9,3 %. Количество ампликонов длиной 1500 п. н. и 2500 п. н. составляло 6,9 %. Количество ампликонов длиной 550 п. н., 700 п. н. и 900 п. н. составляло 2,3 %. Количество ампликонов длиной 400 п. н. и 750 п. н. составило 11,7 %.

Заключение. Таким образом, в наших исследованиях обнаружены специфические особенности распределения аллельных вариантов ДНК-маркеров могут характеризовать направление селекционно-племенной работы, которая ведется в данном хозяйстве. Вариаций выявленных ампликонов достаточно, чтобы формировать селекционные группы. Для повышения генетического разнообразия исследованной популяции нивкивського чешуйчатого карпа целесообразно подбор родительских пар по ряду использованных ISSR-праймеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрияшева, М. А. Концепция сохранения генофонда природных популяций рыб / М. А. Андрияшева // ГОСНИОРХ, СПб, 1996. – 66 с.
2. Базалий, В. В. Основы рибохозяйственной генетики: науч. пособ. / В. В. Базалий, И. М. Шерман, Ю. В. Пилипенко. – Херсон: Олди-плюс, 2007. – 279 с.
3. Сулимова, Г. И. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г. И. Сулимова // Генетика. – 1995. – Т. 31. – № 9. – С. 1294–1299.
4. Фермерское рыбководство / И. И. Грициняк [и др.]. – К.: Герб, 2008. – 560 с.
5. Шерман, И. М. Разведение и селекция рыб / И. М. Шерман, М. В. Гринжевский, И. И. Грициняк. – К.: – БМТ, 1999. – 238 с.
6. Abot, P. Individual and population variation in vertebrates revealed by Intersimple sequence Repeats (ISSRs) \ P. Abot // J. Insect Sci. – 2001. – V. 1, № 8. – P. 15–18.
7. Buntjer, J. B., Otsen M., Nijman I. J., Kuiper M. T. R., Lenstra J. A. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. // Heredity. – 2002. – V.88. – N. 1. – P. 46.
8. Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of Inter simple-sequence repeats // Theoret. Appl. Genet. – 1994. – V. 89. – P. 998–1006.
9. Neve, G., Meglecz, E. Microsatellite frequencies in different taxa // Trends Ecol. Evol. 2000; V15:№ 9. – 376–377.
10. <http://www.totallab.com>.
11. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Higuchi, R. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. – 1988. – V. 239. – N. 2. – P. 487–491.
12. Schlotterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // Chromosoma. – 2000; V. 109. – P. 365–371.
13. Wallace, R. B. DNA recombinant technology. Boca Raton (Fla.) // CRC press, 1983. – 212 p.
14. Wintero, A. K. Variable (d Y-d T)n-(d C-d A)n sequence in the porcine genome / A. K Wintero, M. Fredhoem, P. D. Tomsen // Genomics. – 1992. – V. 12. – P. 281–288.