

ДРОМАШКО С.Е.[✉], СЛУКВИН А.М., КОНЕВА О.Ю., РОВБА Е.А., САСИНОВИЧ М.А., ШЕВЦОВА С.Н.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by

[✉] *S.Dromashko@igc.by, +375 (17) 284-21-90, +375 (29) 777-529-03*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕСНОВОДНЫХ ВИДОВ И ПОРОД ЖИВОТНЫХ (РЫБЫ, РАКИ, МОЛЛЮСКИ)

Цель. Описание результатов молекулярно-генетического исследования ряда видов рыб, раков и моллюсков. **Методы.** Для анализа использованы методы RAPD, SSR, ДНК-штрихкодирования. **Результаты.** Выявлены уникальные RAPD-ампликоны, позволяющие дифференцировать лахвинскую, тремлянскую и изобелинскую породы карпа. С помощью SSR-маркеров установлена днестровско-днепровская и камская популяционная принадлежность стерляди, выращиваемой в двух хозяйствах Беларуси. Разработана инструкция по применению молекулярно-генетического анализа для установления видовой принадлежности мяса и черной икры осетровых рыб. Изучен видовой состав и генетический полиморфизм у длиннопалого рака в водоемах Брестской и Гомельской областей. Начаты работы по ДНК-штрихкодированию моллюсков. **Выводы.** Составлены молекулярно-генетические паспорта пород карпа белорусской селекции. Определена популяционная принадлежность стерляди в двух хозяйствах Беларуси. Инструкция по применению молекулярно-генетического анализа для установления видовой (популяционной) принадлежности рыб семейства осетровых и продукции из них внедрена в стране и используется для тестирования и сертификации продукции осетровых. Установлено, что для Белорусского Полесья наибольшим генетическим разнообразием обладают популяции длиннопалого рака в водоемах Гомельской области.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, карп, осетровые, длиннопалый рак, моллюски.

В настоящее время во всех развитых странах мира активно развиваются методы генотипирования живых объектов, ценных с экологической, фармацевтической и/или сельскохозяйственной точек зрения. Масштаб и важность изучения генетического разнообразия и

создания ДНК-сертификатов и их электронных аналогов подтверждается тем фактом, что в некоторых странах уже изданы правовые акты, регулирующие этот процесс. Например, соответствующий закон принят в Российской Федерации. В США Национальными институтами здравоохранения (NIH) разработаны правила, касающиеся исследований, финансируемых этой организацией [1], которые с 24 августа 2014 г. регулируют вопросы обмена геномными данными. Указанная политика охватывает такие области, как клинические и медицинские исследования; обмен научными данными; передача технологий и инноваций; координация, сотрудничество и отчетность в области научной политики; биобезопасность, биозащита и развивающаяся биотехнология. На международном уровне этот вопрос остро встал после вступления в силу Нагойского протокола регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования на справедливой и равной основе выгод от их применения к Конвенции о биологическом разнообразии [2]. В частности, на последнем совещании сторон-членов Нагойского протокола в Мексике представители ряда стран Африки и Латинской Америки выдвинули предложение включить электронные базы данных о нуклеотидных последовательностях в список генетических ресурсов.

В статье сообщается о результатах работы лаборатории моделирования генетических процессов по изучению генетического разнообразия и сертификации рыб (каarp белорусской селекции, осетровые и продукция из них и т. п.), ракообразных (длиннопалый рак) и моллюсков (прудовик, дрейссена, анодонта и др.). Описаны информационные ресурсы по молекулярно-генетическому анализу ряда видов рыб.

Материалы и методы

Процесс определения генотипа индиви-

© ДРОМАШКО С.Е., СЛУКВИН А.М., КОНЕВА О.Ю., РОВБА Е.А., САСИНОВИЧ М.А., ШЕВЦОВА С.Н.

дуума осуществляется с использованием множества молекулярно-генетических методов, в частности таких, как ПЦР – полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК, гибридизация, ДНК-микрочипы и т. д. Также, широко применяются такие популярные молекулярные методы оценки генетического разнообразия, как RFLP, SSLP, AFLP, RAPD, VNTR, SSR, SNP, STR, SFP, DaT, RAD и др. В лаборатории моделирования генетических процессов для изучения генетического разнообразия и сертификации рыб (каarp *Cyprinus carpio* L. белорусской селекции, осетровые *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, *Acipenser baerii* Brandt, *Acipenser ruthenus* L. и продукция из них и т.п.), ракообразных (длиннопалый рак *Astacus leptodactylus* Esch.) и моллюсков (большой прудовик *Lymnaea stagnalis* L., прудовик болотный *Lymnaea corvus* Müller, дрейссена речная *Dreissena polymorpha* Pallas, беззубка обыкновенная европейская *Anodonta cygnea* L. и др.) используются RAPD- и SSR-маркеры, а также маркеры мтДНК COI и 16S рДНК. На основании этих исследований созданы справочно-информационные ресурсы «Применение молекулярно-генетического анализа для установления видовой (популяционной) принадлежности рыб семейства осетровых и продукции из них» (2016 г.) и «Молекулярно-генетический анализ в паспортизации пород карпа *Cyprinus carpio* L. белорусской селекции» (2017 г.).

Результаты и обсуждение

В результате выполнения исследований в рамках подпрограммы «Сельскохозяйственная биотехнология (животные)» государственной программы «Инновационные биотехнологии» изучено генетическое разнообразие пород карпа *Cyprinus carpio* L. белорусской селекции с использованием полиморфных маркеров. Методом RAPD-PCR-анализа впервые для карпа белорусской селекции выявлены праймеры и ампликоны по ним, которые могут использоваться для характеристики породы, в частности показано, что информативными, т. е. обладающими дифференцирующей способностью, являются праймеры N21 и OpF-05 [3].

Разработана схема генетического паспорта породы карпа, включающая:

- 1) используемый для генетического типирования метод;
- 2) праймер (название, последовательность), дающий эффективные ампликоны для

идентификации породы;

3) молекулярный вес ПЦР-фрагмента (ов), являющийся генетическим маркером породы (в парах оснований);

4) изображение геля продуктов амплификации по данному праймеру с обозначением участков, содержащих молекулярные маркеры породы.

На основании этой схемы предложены формулы генетического паспорта для пород карпа белорусской селекции [4]:

- для *лахвинского карпа*: RAPD-N21₁₅₁₇N21₁₃₃₀N21₃₆₂;

- для *тремлянского карпа*: RAPD-N21₁₈₇₃N21₁₄₉₅N21₆₁₅;

- для *изобелинского карпа*: RAPD-OpF-05₁₅₄₉OpF-05₉₆₁OpF-05₃₃₅.

Примечательно, что, в отличие от осетровых, в случае карпа использование микросателлитов для сертификации было не очень информативным. Микросателлитные маркеры по праймерам MFW-7, MFW-16, MFW-28, MFW-31 дали информацию о генетическом разнообразии пород карпа белорусской селекции и межпородных различиях, которой недостаточно для включения в паспорт породы. В то же время для некоторых отводок обнаружены специфические аллели по исследуемым микросателлитным локусам, которые могут быть использованы в качестве дополнительного генетического маркера [5]:

- для *лахвинской чешуйчатой отводки* был обнаружен специфический ампликон – тип 6 (282 п. о.) по праймеру MFW28 (частота встречаемости в выборке 30,77 %);

- для *лахвинской зеркальной отводки* было обнаружено отсутствие ампликонов – тип 17 (263–267 п. о.) по праймеру MFW7 и тип 13 (167–176 п. о.) по праймеру MFW16, которые встречаются у всех других пород и отводок;

- для *тремлянской зеркальной отводки* по праймеру MFW7 был обнаружен специфический ампликон – тип 7 (517 п. о.) (частота встречаемости в выборке 30,00 %);

- для *изобелинской «Столин XVIII» отводки* обнаружен специфический ампликон – тип 1 (326 п. о.) по праймеру MFW-28 с частотой встречаемости 57,14 %;

- для остальных отводок изучаемых пород карпа (*тремлянская чешуйчатая, изобелинская «Смесь зеркальная», изобелинская «Смесь чешуйчатая», изобелинская «Триприм»*) по исследуемым микросателлитным локусам (MFW-7,

MFW-16, MFW-28, MFW-31) НЕ ОБНАРУЖЕНО СПЕЦИФИЧЕСКИХ АМПЛИКОНОВ, частота встречаемости которых позволяла бы использовать их для паспортизации.

Группой исследователей под руководством к. б. н. А. М. Слуквина было доказано, что выращиваемая в ОАО «Рыбхоз «Полесье» (Пинский район Брестской области) стерлядь *Acipenser ruthenus* L., которая в свое время была завезена из Конаковского завода по осетроводству (Волжский регион), относится не к волжской, а к днепровско-днестровской популяции. Межвидовых гибридов в маточном стаде стерляди, выращиваемом в хозяйстве, не обнаружено, что может свидетельствовать об их видовой генетической чистоте. Следовательно, рыбопосадочный материал стерляди из этого хозяйства является пригодным для выпуска в водотоки бассейна Днепра с целью восстановления краснокнижной днепровской популяции стерляди [6]. В то же время стерлядь, выращиваемая в ООО «Терра-Фиш» (Чашникский район Витебской области), также завезенная из Конаково, была отнесена к камской популяции стерляди и была рекомендована только для товарного выращивания и на икру. Таким образом, результаты генетических исследований позволили осуществить ревизию маточных стад стерляди в двух рыбоводных хозяйствах страны и наметить пути их практического использования в аквакультуре и для целей сохранения биоразнообразия в естественных водотоках.

Начат процесс ДНК-идентификации других видов осетровых и продуктов из них (в частности икры и мяса). Потребность в таких исследованиях определяется тем, что русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) подпадает под ограничения СИТЕС – Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения. В связи с этим важно уметь отличать русского осетра от сибирского, стерляди или другого вида осетровых, не подпадающих под эти ограничения. Мы разработали «Инструкцию по применению молекулярно-генетического анализа для определения видов (популяции), принадлежащих рыбам семейства осетровых и их продуктов», одобренную научно-техническим советом Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и рекомендованную для использования специалистами агропромышленного комплекса, а также оформили электронную справочно-

информационную систему на эту тему [7].

Генетические исследования по осетровым видам рыб будут продолжены, и уже с текущего года по линии ГКНТ стартует белорусско-польский проект по восстановлению популяции проходного атлантического остроного осетра на тему «Разработать основы для восстановления балтийской популяции атлантического осетра (*Acipenser oxyrhynchus oxirhynchus* Mitchill) в бассейне реки Неман». Целью проекта является восстановление исчезнувшей аборигенной естественной популяции диадромного вида атлантического балтийского осетра в реках на территории Республики Беларусь за счет использования существующих генетических ресурсов балтийского осетра в Республике Польша. Исследования направлены на воссоздание диких популяций балтийского осетра в трансграничных водотоках Республики Беларусь с использованием аквакультурных возможностей польской стороны. Выполнение поставленной цели позволит обогатить естественные водотоки на территории Республики Беларусь еще одним представителем осетровых видов – проходным балтийским осетром, что направлено на сохранение и увеличение биологического разнообразия рек и на рост экономической устойчивости трансграничных регионов за счет развития осетроводства. В дальней перспективе – это придание виду бинарного статуса с возможностью хозяйственного освоения (для целей воспроизводства, или рекреационного любительского лицензионного лова) вновь формируемых популяций на зарыбляемых трансграничных участках рек.

Проект включает оценку аквакультурных популяций балтийского осетра и их генетической чистоты в Польше, а также оптимизацию отработки технологии выращивания жизнестойкой молоди и в дальнейшем ремонтно-маточного стада балтийского осетра, впервые создаваемого в Беларуси на базе рыбоводного хозяйства. Восстановление природных популяций диадромного остроного балтийского осетра в реках бассейна Балтийского моря требует развития современного, эффективного сектора аквакультуры, который специализировался бы на отработке технологий выращивания этого вида осетровых на различных стадиях развития. С этой целью научные исследования в рамках предлагаемого проекта будут сосредоточены на улучшение уже существующих технологий выращивания молоди балтийского осетра, в частности инновационных методов выращивания в

условиях аквакультуры Республики Беларусь. В дальнейшем по мере формирования ремонтно-маточных стад балтийского осетра на территории Беларуси будут проведены работы по генетическому тестированию производителей, обеспечивающие высокий уровень полиморфизма, гарантирующие биологическую безупречность потомства при выпуске в естественную среду.

В настоящее время в рамках подпрограммы «Структурная и функциональная геномика» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» начаты работы по использованию ДНК-штрихкодирования для идентификации видов водных животных (моллюски, ракообразные).

Выполнены молекулярно-генетические исследования в популяциях десятиногих раков по восьми водоемам Брестской и Гомельской областей. С использованием фрагмента гена COI мтДНК во всех изученных водоемах с вероятностью 98–99 % был зарегистрирован вид – длиннопалый рак (*Astacus leptodactylus* Esch.) [8]. С помощью молекулярных маркеров мтДНК было установлено, что наиболее гетерогенными популяциями раков в Брестской области являются популяции раков в озерах Олтуш и Соминское, а по Гомельской области – в водохранилищах Княжеборское и Светлогорское. При сравнительном анализе популяций раков в Брестской и Гомельской областях установлено, что уровень генетического разнообразия, определенный по количеству несинонимических замен, в популяциях длиннопалых раков из озер Гомельской области в 11,3 раза выше, чем у раков в водоемах Брестской области.

Исследована экспрессия гена металлотионеина у моллюска *Lymnaea stagnalis* в ответ на воздействие солей тяжелых металлов [9]. Это является первым шагом для разработки молекулярно-генетической тест-системы в экспресс-оценке качества поверхностных вод. Начаты работы по ДНК-штрихкодированию моллюсков

Dreissena polymorpha, *Lymnaea corvus*, *Anodonta cygnea*, *Coretus corneus*.

Выводы

Выявлены уникальные RAPD-ампликоны, позволяющие дифференцировать лахвинскую, тремлянскую и изобелинскую породы карпа белорусской селекции. На этой основе составлены молекулярно-генетические паспорта белорусских пород карпа и разработана соответствующая электронная справочно-информационная система. С помощью SSR-маркеров установлена принадлежность стерляди, выращиваемой в ОАО «Рыбхоз «Полесье» Брестской области, к днепровско-днестровской популяции, подтверждена также генетическая чистота вида. Таким образом, стерлядь из этого хозяйства пригодна для зарыбления водотоков бассейна Днепра с целью восстановления аборигенной днепровской популяции стерляди. Доказано, что стерлядь, выращиваемая в ООО «ТерраФиш» Витебской области, относится к камской популяции, поэтому ее следует использовать только для товарного выращивания и для производства черной икры. Исследована возможность применения молекулярно-генетического анализа для установления видовой (популяционной) принадлежности осетровых рыб и идентификации продукции из них. Разработаны соответствующая инструкция, утвержденная Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, и информационный ресурс на ее основе. Оценен генетический полиморфизм длиннопалого рака в водоемах Брестской и Гомельской областей. Показано, что наибольшим генетическим разнообразием обладают популяции из водоемов Гомельской области. Начаты работы по ДНК-штрихкодированию моллюсков. С текущего года стартует международный проект по восстановлению в водотоках Беларуси исчезнувшей в свое время балтийской популяции атлантического остроного осетра (*Acipenser oxyrinchus oxirinchus* Mitchell).

Литература

1. NIH Genomic Data Sharing Policy, NOT-OD-14-124. *National Institutes of Health*. URL: <https://grants.nih.gov> (дата обращения: 03.08.2017).
2. Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity. *World Intellectual Property Organization*. URL: <http://www.wipo.int/wipolex/ru/details.jsp?id=12294> (дата обращения: 03.08.2017).
3. Дромашко С.Е., Конева О.Ю. Генетическая паспортизация пород белорусского карпа. *Наука и инновации*. 2010. № 11 (93). С. 36–40.
4. Дромашко С., Конева О., Ровба Е. Генотипирование пород карпа *Cyprinus carpio* L. белорусской селекции. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017. 100 с.

5. Ровба Е.А., Конева О.Ю., Дромашко С.Е. Оценка генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции с помощью микросателлитных маркеров. *Молекулярная и прикладная генетика. Сб. трудов.* 2012. Т. 13. С. 64–73.
6. Лесюк М.И., Конева О.Ю., Ровба Е.А., Слуквин А.М. Молекулярно-генетические исследования производителей стерляди (*Acipenser ruthenus* L.). *Молекулярная и прикладная генетика. Сб. трудов.* 2012. Т. 13. С. 110–117.
7. Дромашко С.Е., Слуквин А.М., Конева О.Ю., Ровба Е.А. Генетический анализ в установлении видовой принадлежности рыб семейства осетровых и продукции из них. *Качество и экологическая безопасность пищевых продуктов и производств: материалы Междунар. науч. конф. с элементами научной школы для молодежи.* Тверь: Твер. гос. ун-т, 2017. С. 10–14.
8. Сасинович М.А., Слуквин А.М., Алехнович А.В. Использование методов биоинформатики при изучении генома в популяциях десятиногих раков. *Математические методы в технике и технологиях: сб. тр. междунар. науч. конф.: в 12 т. Т. 12, ч. 2.* СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2017. С. 70–75.
9. Дромашко С.Е., Шевцова С.Н., Бабенко А.С. Воздействие свинца и кадмия на экспрессию металлотиионеина у половозрелых особей *Lymnaea stagnalis* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.: Логос, 2017. Т. 21. С. 281–285.*

References

1. NIH Genomic Data Sharing Policy, NOT-OD-14-124. *National Institutes of Health.* URL: <https://grants.nih.gov> (last accessed: 03.08.2017).
2. Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity. *World Intellectual Property Organization.* URL: <http://www.wipo.int/wipolex/ru/details.jsp?id=12294> (last accessed: 03.08.2017).
3. Dromashko S.E., Koneva O.Yu. Genetic certification of Belarusian carp breeds. *The Science and Innovations.* 2010. No. 11 (93). P. 36–40.
4. Dromashko S., Koneva O., Rouba E. Genotyping of *Cyprinus carpio* L. carps of Belarusian breeding. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017. 100 p.
5. Rouba E.A., Koneva O.Yu., Dromashko S.E. Estimation of genetic diversity for Belarusian carp breeds using microsatellite markers. *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* 2012. Vol. 13. P. 64–73.
6. Lesiuk M.I., Koneva O.Yu., Rouba E.A., Slukvin A.M. Molecular genetic studies of sterlet breeders (*Acipenser ruthenus* L.). *Molecular and Applied Genetics: Proceedings.* 2012. Vol. 13. P. 110–117.
7. Dromashko S.E., Slukvin A.M., Koneva O.Yu., Rouba E.A. Genetic analysis in determining the species belonging to the family of sturgeon fish and products from them. *Kachestvo i ekologicheskaya bezopasnost pishchevykh produktov i proizvodstv: materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii s elementami nauchnoy shkoly dlya molodezhi.* Tver: Tverskoy gosudarstvenny universitet, 2017. S. 10–14.
8. Sasiniovich M.A., Slukvin A.M., Alekhovich A.V. Use of bioinformatics methods in studying the genome in populations of decapod crayfish. *Matematicheskiye metody v tekhnike i tekhnologiyakh: sbornik trudov mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii: v 12 t. Т. 12, ch. 2.* SPb.: Izdatelstvo Politekhnicheskogo universiteta, 2017. S. 70–75.
9. Dromashko S.E., Shevtsova S.N., Babenko A.S. Lead and cadmium influences on the metallothionein expression level in *Lymnaea stagnalis* L. adults. *Factors in Experimental Evolution of Organisms: Proceedings.* K.: Logos, 2017. T. 21. S. 281–285.

DROMASHKO S.E., SLUKVIN A.M., KONEVA O.Yu., ROUBA A.A., SASINOVICH M.A., SHEVTSOVA S.N.
Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by

MOLECULAR-GENETIC TESTING OF FRESHWATER SPECIES AND BREEDS OF ANIMALS (FISH, NARROW-CLAWED CRAYFISH, MOLLUSKS)

Aim. Description of the results of molecular genetic studies of a number of fish, narrow-clawed crayfish, and mollusk species. **Methods.** For the analysis, RAPD, SSR, and DNA-barcoding methods were used. **Results.** Unique RAPD amplicones were identified to differentiate Lahvinsky, Tremlyansky and Isobelinsky carp breeds. With the use of SSR markers, the Dniester-Dnieper and Kama population belonging to the sterlet, grown in two farms of Belarus, was established. An instruction on the application of molecular genetic analysis to establish the species belonging to meat and caviar of sturgeon species was developed. The species composition and genetic polymorphism in narrow-clawed crayfish in reservoirs of Brest and Gomel regions was estimated. The work on DNA-barcoding of mollusks has begun. **Conclusions.** Molecular-genetic passports of carp breeds of Belarusian breeding are compiled. The population belonging to sterlet is determined in two fish farms in Belarus. Instruction for the use of molecular genetic analysis to establish the species (population) belonging to the sturgeon fish and their products is introduced in the country and used for testing and certification of sturgeon products. For the Byelorussian Polesie region, it is established that the narrow-clawed crayfish in the Gomel region reservoirs has the greatest genetic diversity.

Keywords: molecular markers, carp, sturgeon, narrow-clawed crayfish, mollusks.

ДРОМАШКО С.Є., СЛУКВІН О.М., КОНЕВА О.Ю., РОББА О.А., САСІНОВІЧ М.О., ШЕВЦОВА С.М.
*Інститут генетики і цитології НАН Білорусі,
Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНЕ ТЕСТУВАННЯ ПРІСНОВОДНИХ ВИДІВ І ПОРІД ТВАРИН (РИБИ, РАКОПОДІБНІ, МОЛЮСКИ)

Мета. Опис результатів молекулярно-генетичного дослідження ряду видів риб, раків і моллюсків. **Методи.** Для аналізу використані методи RAPD, SSR, ДНК-штрихкодирования. **Результати.** Виявлено унікальні RAPD-амплікона, що дозволяють диференціювати лахвінську, тремлянську і ізобелінську породи коропа. За допомогою SSR-маркерів встановлена дністровсько-дніпровська і камська популяційна приналежність стерляді, вирощуваної в двох господарствах Республіки Білорусь. Розроблено інструкцію по застосуванню молекулярно-генетичного аналізу для встановлення видової приналежності м'яса і чорної ікри осетрових видів риб. Вивчено видовий склад і генетичний поліморфізм у довгопалого раку в водоймах Брестської і Гомельської областей. Розпочато роботи по ДНК-штрихкодирования моллюсків. **Висновки.** Визначено популяційна приналежність стерляді в двох господарствах рибоводів Білорусі. Інструкція по застосуванню молекулярно-генетичного аналізу для встановлення видової (популяційної) приналежності осетрових риб і продукції з них впроваджена в країні і використовується для тестування і сертифікації продукції осетрових. Встановлено, що для Білоруського Полісся найбільшим генетичним розмаїттям володіють популяції довгопалого раку в водоймах Гомельської області.
Ключові слова: молекулярні маркери, короп, осетрові, довгопалый рак, моллюски.