

В. П. Терлецкий, В. И. Тыщенко, Ю. С. Щербаков

Сравнительная характеристика генетического разнообразия групп форели породы росталь методом мультилокусного анализа

Аннотация. Аквакультура обеспечивает население высококачественными продуктами питания, содержащими целый ряд ценных витаминов, минералов и омега кислот. Успешное разведение рыбы в искусственных условиях проблематично без создания новых и продуктивных пород рыбы. Породы радужной форели пользуются устойчивым спросом на рынке. В условиях ФСГЦР Ропша, разводится форель породы росталь, которая создана при помощи семейной селекции и индивидуального отбора. Полученная порода обладает высокой продуктивностью и адаптацией в условиях холодноводных хозяйств. Целью работы было выявить особенности генетической структуры различных групп радужной форели породы росталь методом мультилокусного анализа с применением меченого дезоксигенином ДНК-зонда (GGAT)₄. Использование методов, позволяющих выявлять одновременно множественный полиморфизм, увеличивает производительность анализа. Современные компьютерные программы по данным распределения фрагментов ДНК рассчитывают популяционно-генетические параметры. Ранее нами проводилась работа на радужной форели с выявлением особенностей генетической организации на уровне популяций разных пород. В рамках данного исследования изучены характеристики отдельных групп форели из различных бассейнов и имеющих различное происхождение. Установлено, что у отдельных групп имеются маркерные фрагменты ДНК, что и отличает их от других групп. Максимальная генетическая разница найдена между группами А и С, В и D. Группы D и С, А и D оказались близкородственными. Использование полученных данных селекционерами, поможет им обоснованно подходить к процессу отбора и подбора, так как известна генетическая характеристика особей. Полученные результаты показали, что при продолжительном разведении путем семейной селекции наблюдается снижение генетического разнообразия, хотя при переходе на массовую селекцию генетическое разнообразие повышается.

Ключевые слова: мультилокусный анализ; ДНК-зонд; популяция; гетерозиготность; генетическое разнообразие; форель; молекулярная гибридизация.

Авторы:

Терлецкий Валерий Павлович — доктор биологических наук; e-mail: valeriter@mail.ru;

Тыщенко Валентина Ивановна — кандидат биологических наук; e-mail: tinatvi@mail.ru;

Щербаков Юрий Сергеевич — аспирант лаборатории молекулярной генетики; e-mail: yura.10.08.94.94@mail.ru;

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «ФНЦ животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, 196601, Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55а.

Введение. Разведение при помощи семейной селекции, позволяет улучшить товарные и продуктивные качества рыбы, а так же повысить резистентность к бактериальным заболеваниям и фиксировать генетическое разнообразие при выведении новых групп. Основной целью при выведении новой породы радужной форели росталь, заключалась в улучшении показателей темпов роста и набора биомассы, репродуктивности в условиях Северо-Запада. В течение 25 лет, методом индивидуального отбора и семейной селекции создана порода радужной форели росталь. В условиях Северо-Запада, в возрасте четырех лет производители данной породы имеют среднюю массу в 2.5 кг и рабочую плодовитость 5.5 тыс. икринок. На одну самку, при двух летнем цикле выращивания приходится около 900 кг товарной продукции.

Радужная форель родом из тихоокеанских рек Северной Америки, от Аляски до Мексики. В 1880 г. она завезена в Европу, а затем, примерно в 1895 г., в Россию. Генетическому разнообразию форелей уделяют большое внимание, т.к. ее исходные формы часто используются в селекции при выведении новых пород промышленной рыбы [1]. Пресноводная радужная форель генетически заметно отличается от морских форм лососевых, таких как стальноголовый лосось [2]. Дифференциация на субпопуляции происходит вследствие появления непреодолимых барьеров при миграции рыбы и антропогенном воздействии при вылове рыбы и выпуске мальков во внешнюю среду [3; 4]. Особое значение имеет изменение численности самок [5]. Молекулярно-генетические методы, в частности, микросателлитный ана-

лиз, широко применяются для характеристики популяций *Oncorhynchus mykiss* [6; 7; 8] и для идентификации пола рыб [9]. Мультилокусные методы позволяют одновременно детектировать множество генетических локусов в геноме, выявляя множественные полиморфизмы. Такой подход оказался успешным как для характеристики отдельных особей (происхождение), так и для выявления генетических особенностей в группах особей.

Цель исследований — выявление особенностей генетической структуры различных групп радужной форели породы росталь методом мультилокусного анализа с применением меченого дезоксигенином ДНК-зонда (GGAT)4.

Материалы и методы. Для исследования были взяты четыре группы форели породы росталь А (бассейн 7), В (бассейн 11), С (бассейн 8), D (фабричный участок) (Рис. 1).

ДНК выделяли из 60 мкл крови, проводили очистку, определяли количество и качество ДНК на спектрофотометре NanoDrop2000. Детекция продуктов молекулярной гибридизации проводилась как описано ранее [10; 11], за исключением того, что вместо зонда (GTG)5 использовали зонд (GGAT)4. Вкратце, выделенная геномная ДНК расщеплялась путем использования рестриктазы *Hae*III, был подготовлен 0.8% агарозный гель для проведения электрофореза, далее фрагменты ДНК были перенесены с геля на нейлоновый фильтр с использованием вакуума, гибридизовали ДНК с меченым олигонуклеотидным зондом (GGAT)4, выявление дезоксигенина осуществляли с помощью иммунохимической цветной реакции на фильтре. По полученным результатам провели генетического разнообразия выявленных минисателлитных локусов. Расчеты проводили по программе Gelstats™. Выравнивание гибридизационных полос на фильтре осуществлялось с помощью программы RFLPscan™ по фрагментам маркерной ДНК (рестрикты фага лямбда, двойное расщепление ферментами *Hind*III и *Bst*EII).

Результаты и их обсуждение. Реакция молекулярной гибридизации с зондом приводила к формированию 30–40 полос на фильтре, число и распределение которых было характерным как для отдельных особей, так и групп рыбы (Рис. 2).

При анализе частот встречаемости фрагментов ДНК были выявлены мономорфные полосы № 28 и 29. У группы А были найдены полосы № 16, 18, 20 встречающиеся у всех особей и встречающиеся в группах В, С и D со значительно меньшей частотой. Имелись отличия и в других частотах по группам (табл. 1).



Рис. 1. Селекционные группы форели породы росталь

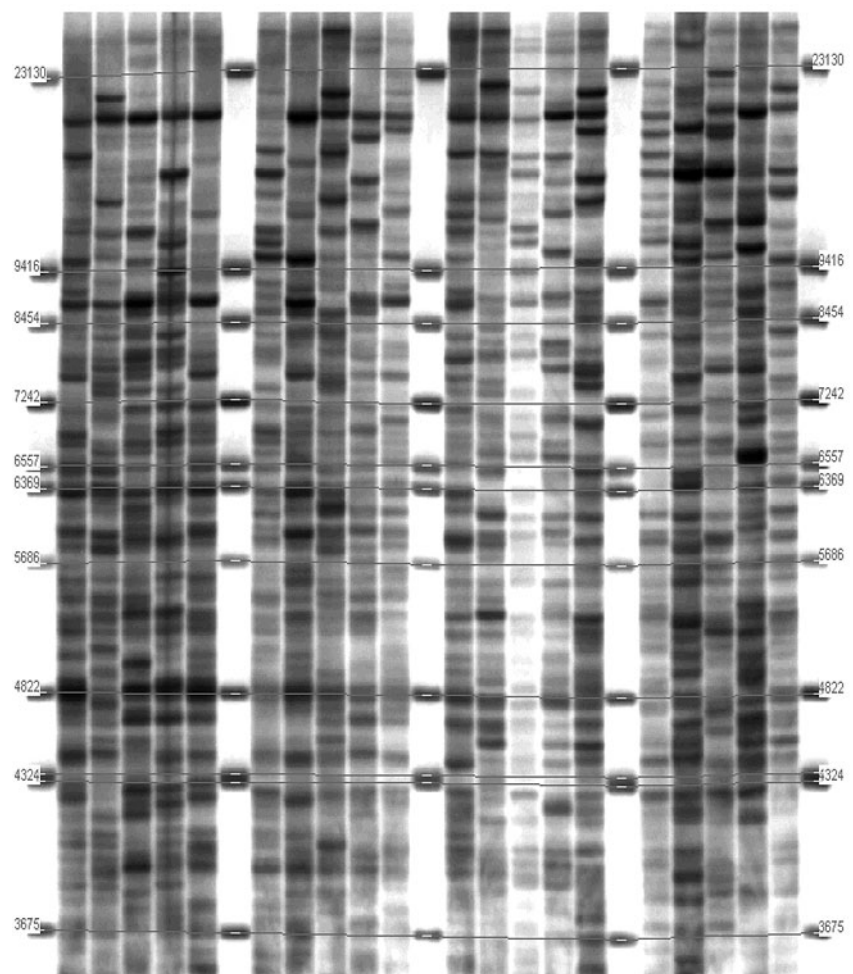


Рис. 2. Мультилокусный анализ ДНК форели породы росталь

Среди сформированных опытных групп наибольшая вероятность встречаемости двух одинаковых генотипов в группах А и С. Группы В и D по изучаемым минисателлитным локусам генетически более разнородные (табл. 2). Максимальный коэффициент сходства отмечен между особями в группе А, а минимальный в группе D (фабричный участок). Эти расчеты полностью отражают схему селекции по группам. При длительной семейной селекции значительно увеличивается генетическое сходство внутри группы, резко снижается гетерозиготность (группа А). При умеренном инбридинге (группа С) гетерозиготность возрастает в два раза, коэффициент сходства внутри группы снижается (Табл. 3). При переводе группы на массовую селекцию происходит резкое уменьшение коэффициента сходства в группе и уве-

личение гетерозиготности в полтора раза. При массовом разведении форели породы Росталь отмечен высокий уровень гетерозиготности, характерный для не очень большой популяции рыбы.

Между группами радужной форели породы росталь было обнаружено, путем расчёта популяционно-генетических параметров, большое сходство группы А со всеми остальными группами. Расчет D между группами форели проводился с помощью программы Gelstats, а затем с применением пакета программ PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) и по методу присоединения соседей (neighbor joining) было построено дерево, графически отображено с помощью iTOL v4 (Interactive Tree Of Life) (рис. 3).

Наименьший коэффициент сходства показали группы В, С, D. Генетические расстояния между

Таблица 1. Частота встречаемости фрагментов ДНК в четырёх группах форели породы росталь на картине гибридизации с зондом (GGAT)⁴

Номер полосы	Частота встречаемости полосы			
	Группа А	Группа В	Группа С	Группа D
1	1.0000	0.3000	0.6000	0.3333
2	1.0000	0.2000	0.6000	0.3333
3	1.0000	0.6000	0.0000	0.3333
4	0.4000	0.3000	0.1000	0.4444
5	0.9000	0.4000	0.2000	0.5556
6	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
7	0.6000	0.3000	0.2000	0.2222
8	0.1000	0.4000	0.6000	0.6667
9	0.1000	0.1000	0.0000	0.2222
10	0.9000	1.0000	0.7000	0.6667
11	0.2000	0.0000	0.0000	0.0000
12	0.0000	0.4000	0.0000	0.2222
13	0.0000	0.4000	0.0000	0.4444
14	0.7000	0.1000	0.2000	0.0000
15	0.8000	0.5000	0.2000	0.3333
16	1.0000	0.1000	0.1000	0.5556
17	0.7000	0.6000	0.7000	0.4444
18	1.0000	0.8000	0.2000	0.8889
19	0.7000	0.1000	0.8000	0.1111
20	1.0000	0.3000	0.1000	0.5556
21	1.0000	0.7000	1.0000	0.6667
22	0.9000	0.7000	0.1000	0.2222
23	0.0000	0.1000	0.0000	0.1111
24	1.0000	0.3000	1.0000	0.5556
25	0.0000	0.3000	0.0000	0.3333
26	1.0000	0.7000	1.0000	0.4444
27	1.0000	0.6000	0.6000	0.7778
28	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
29	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
30	0.0000	0.7000	0.2000	0.1111
31	0.0000	0.1000	0.0000	0.3333

Таблица 2. Популяционно-генетические параметры разных групп форели росталь

Сравниваемые группы	n	Количество полос на дорожку $\bar{X} \pm m$	Вероятность встречаемости двух одинаковых генотипов, P	Коэффициент сходства внутри группы, BS
Группа А	10	19.00±0.70	1.07×10^{-1}	0.89
Группа В	10	13.20±1.04	6.25×10^{-4}	0.57
Группа С	10	11.20±0.89	2.25×10^{-2}	0.71
Группа D	9	12.89±0.71	3.833×10^{-4}	0.54

группами были рассчитаны по Lynch (1990) [13]. Максимальное генетическое разнообразие отмечено у групп А и С, В и D. Важно отметить что, в последней паре групп проводится массовое скрещивание рыб. Умеренно удаленными друг от друга оказались группы А и В, В и С. Наиболее близкородственными являются группы D и С, А и D. Оценка генотипа позволит быстрее и грамотнее подбирать группы особей, с целью дальнейшего семейного и индивидуального отбора. Данный метод позволит улучшить качество оценки гетерогенности и позволит в дальнейшем использовать ДНК маркеры в селекционной работе с радужной форелью.

Закключение. По полученным результатам можно сделать вывод, что при массовой селекции генетическое разнообразие популяции увеличивается, в то время как при разведении путем семейной селекции происходит резкое снижение гетерогенности.

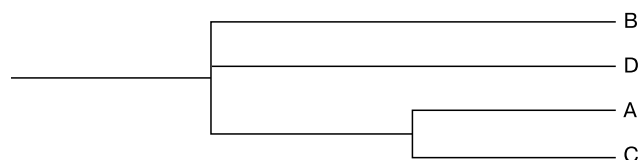


Рис. 3. Дерево взаимосвязей групп форели

Таблица 3. Внутрипопуляционные генетические параметры трёх групп золотистой форели

Группы	n	Доля полиморфных локусов	H ¹	H ²
Группа А	10	0,28	0,13	0,16
Группа В	10	0,67	0,45	0,51
Группа С	10	0,43	0,28	0,31
Группа D	9	0,77	0,51	0,59

H¹ — средняя гетерозиготность по Stephens [12];

H² — скорректированная средняя гетерозиготность по Stephens [12].

*Работа подготовлена в рамках выполнения государственного задания,
номер учета НИОКТР: АААА-А18-118021590138-1*

Литература

- Алтухов Ю. П. Популяционная генетика лососевых рыб / Ю. П. Алтухов, У. В. Салменкова, В. Т. Омельченко // М.: Наука, 1997. — 288 с.
- Satterthwaite W. H. Steelhead life history on California's Central Coast: Insights from a state-dependent model / W. H. Satterthwaite, M. P. Beakes et. al. // Transactions of the American Fisheries Society. — 2009. — V. 138. — № 3. — P. 532–548. DOI: <https://doi.org/10.1577/T08-164.1>.
- Winans G. A. Dam trout: Genetic variability in *Oncorhynchus mykiss* above and below barriers in three Columbia River systems prior to restoring migrational access / G. A. Winans, M. B. Allen, J. Baker, E. Lesko, F. Shrier, B. Strobel, J. Myers // PLOS ONE. — 2018. — V. 13. — № 5: e0197571. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197571>.
- Winemiller K. O. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong / K. O. Winemiller, P. B. McIntyre, L. Castello, E. Fluet-Chouinard, T. Giarrizzo, S. Nam // Science. — 2016. — V. 351. — № 6269. — P. 128–129. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aac7082>.
- O'Connor J. E. 1000 dams down and counting / J. E. O'Connor, J. J. Duda, G. E. Grant // Science. — 2015. — V. 348. — P. 496–497. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaa9204>.
- Winans G. A. genetic and phenetic baseline before the recolonization of steelhead above Howard Hanson Dam, Green River, Washington / G. A. Winans, M. C. Baird, J. Baker // North American Journal of Fisheries Management. — 2010. — V. 30. — № 3. — P. 742–756. DOI: <https://doi.org/10.1577/M09-119.1>.
- Павлов С. Д. Дифференциация камчатских популяций микижи *parasalmo* (*Oncorhynchus*) *mykiss* по локусам микросателлитной ДНК / С. Д. Павлов, А. В. Семенова, М. Н. Мельникова // Известия российской академии наук. Серия биологическая. — 2019. — № 2. — С. 144–153. DOI: 10.1134/S0002332919020127
- Артамонова В. С. Генетическая дифференциация пород радужной форели / В. С. Артамонова, В. А. Янковская, В. М. Голод, А. А. Махров // Труды ИБВВ РАН. — 2016. — Т. 73. — № 76. — С. 25–45.
- Рудь Ю. П. Идентификация пола у радужной форели *Oncorhynchus mykiss* методом полимеразной цепной реакции / Ю. П. Рудь, М. И. Майстренко, Л. П. Бучацкий // Онтогенез. — 2015. — Т. 46. — № 2. — С. 87–93. DOI: 10.7868/S0475145015020081.

10. Митрофанова О. В. Исследование особенностей генетической гетерогенности пород и экспериментальных популяций кур на основе анализа полиморфизма ДНК / О. В. Митрофанова, В. И. Тыщенко, Н. В. Дементьева, В. П. Терлецкий, А. Ф. Яковлев // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. — 2007. — № 6. — С. 36–38.
11. Терлецкий В. П. Молекулярно-генетический анализ популяционной структуры генофондных пород крупного рогатого скота / В. П. Терлецкий, В. И. Тыщенко, Л. Г. Сурундаева, Н. Л. Адаев, Р. Х. Гайрабеков, Е. С. Усенбеков // Молочное и мясное скотоводство. — 2014. — № 6. — С. 5–7.
12. Stephens J. C. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints / J. C. Stephens, D. A. Gilbert, N. Yuhki, S. J. O'Brien // Mol. Biol. Evol. — 1992. — Vol. 9. — P. 729–743.
13. Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting // In: «DNA fingerprinting: approaches and applications». — Basel: Birkhauser Verlag, 1991. — P. 113–126.

Terletskiy V., Tyshchenko V., Scherbakov Yu.

Comparative characteristics of the genetic diversity in groups of trout of the rostal breed by multilocus analysis

Abstract. *Aquaculture provides the population with high-quality food products containing a number of valuable vitamins, minerals and omega acids. Breeding fish in artificial conditions is difficult without creating new and productive fish breeds. The species of rainbow trout turned out to be in steady demand in the market. The Rostal breed, originated from the SGC «Ropsha» through individual and family breeding, is highly adaptable and productive in cold-water conditions. The aim of the work was to identify the features of the genetic structure of various groups of rainbow trout of the Rostal breed by multilocus analysis using a digoxigenin-labeled DNA probe [GGAT]4. Using methods to simultaneously detect multiple polymorphisms increases the analysis throughput. Modern computer programs based on the distribution of DNA fragments calculate population genetic parameters. Earlier, we carried out work on rainbow trout with revealing the features of genetic organization at the level of populations of different breeds. In the framework of this study, the characteristics of individual groups of trout from various basins and having a different origin were revealed. It was established that individual groups have marker DNA fragments that distinguish them from other groups. The maximum genetic divergence was found between group A and group C, group B and group D. The groups A and B, B and C were moderately distant from each other. The groups D and C, A and D turned out to be closest in our study. The data helps breeders to take a scientifically sound approach to the breeding process by selecting individuals or groups of individuals with known genetic characteristics. Studies have shown that with long-term breeding of the group by family, a decrease in heterozygosity is observed, however, with the transition to mass selection, genetic diversity increases.*

Key words: multilocus analysis; DNA probe; population; heterozygosity; genetic diversity; trout; molecular hybridization.

Authors:

Terletskiy V. — Dr. Habil. (Biol. Sci); e-mail: valeriter@mail.ru;

Tyshchenko V. — PhD (Biol. Sci); e-mail: tinatvi@mail.ru;

Scherbakov Yu. — Post graduate student; e-mail: yura.10.08.94.94@mail.ru;

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 196601, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Russia, Tyarlevo, Moscovskoe sh. 55a.

References

1. Altukhov Yu. P. Population genetics of salmon fish / Yu. P. Altukhov, U. V. salmenkova, V. T. Omeljchenko // M.: Nauka, 1997. — 288 p.
2. Satterthwaite W. H. Steelhead life history on California's Central Coast: Insights from a state-dependent model / W. H. Satterthwaite, M. P. Beakes et. al. // Transactions of the American Fisheries Society. — 2009. — V. 138. — № 3. — P. 532-548. DOI: <https://doi.org/10.1577/T08-164.1>.
3. Winans G. A. Dam trout: Genetic variability in *Oncorhynchus mykiss* above and below barriers in three Columbia River systems prior to restoring migrational access / G. A. Winans, M. B. Allen, J. Baker, E. Lesko, F. Shrier, B. Strobel, J. Myers // PLOS ONE. — 2018. — V. 13. — № 5: e0197571. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197571>.
4. Winemiller K. O. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong / K. O. Winemiller, P. B. McIntyre, L. Castello, E. Fluet-Chouinard, T. Giarrizzo, S. Nam // Science. — 2016. — V. 351. — № 6269. — P. 128–129. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aac7082>.
5. O'Connor J. E. 1000 dams down and counting / J. E. O'Connor, J. J. Duda, G. E. Grant // Science. — 2015. — V. 348. — P. 496–497. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaa9204>.
6. Winans G. A. genetic and phenetic baseline before the recolonization of steelhead above Howard Hanson Dam, Green River, Washington / G. A. Winans, M. C. Baird, J. Baker // North American Journal of Fisheries Management. — 2010. — V. 30. — № 3. — P. 742-756. DOI: <https://doi.org/10.1577/M09-119.1>
7. Pavlov S. D. Differentiation of Kamchat populations of *Oncorhynchus mykiss* by microsatellite DNA loci / S. D. Pavlov, A. V. Semenova, M. N. Meljnikova // Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Biological Section. — 2019. — № 2. — P. 144–153. DOI: [10.1134/S0002332919020127](https://doi.org/10.1134/S0002332919020127).
8. Artamonova V. S. Genetic differentiation of Rainbow Trout breeds / V. S. Artamonova, V. A. Yankovskaya, V. M. Golod, A. A. Makhrov // Reports of IBVV RAS. — 2016. — V. 73. — № 76. — P. 25–45.
9. Rudj Yu. P. Sex identification in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* by polymerase chain reaction method / Yu. P. Rudj, M. I. Majstrenko, L. P. Buchatskiy // Ontogenesis. — 2015. — V. 46. — № 2. — P. 87–93. DOI: [10.7868/S0475145015020081](https://doi.org/10.7868/S0475145015020081).
10. Mitrofanova O.V. Study of the genetic heterogeneity of breeds and experimental chicken populations based on DNA polymorphism analysis / O. V. Mitrofanova, V. I. Tyshchenko, N. V. Dementieva, V. P. Terletskiy, A. F. Yakovlev // Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences. — 2007. — № 6. — P. 36–38.
11. Terletskiy V. P. Molecular genetic analysis of population structure of gene pool cattle breeds / V. P. Terletskiy, V. I. Tyshchenko, L. G. Surundaeva, N. L. Adaev, R. H. Gajrabekov, Ye. S. Ussenbekov // Dairy and Beef Cattle Farming. — 2014. — № 6. — P. 5–7.
12. Stephens J. C. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints / J. C. Stephens, D. A. Gilbert, N. Yuhki, S. J. O'Brien // Mol. Biol. Evol. — 1992. — Vol. 9. — P. 729–743.
13. Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting // In: «DNA fingerprinting: approaches and applications». -Basel: Birkhauser Verlag, 1991. — P. 113–126.