Труды ИБВВ РАН, вып. 73(76), 2016

УДК 597.552.51:575.174.015.3

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОРОД РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*PARASALMO MYKISS*), РАЗВОДИМЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В. С. Артамонова[1], В. А. Янковская[2], В. М. Голод[3], А. А. Махров[4]

[1]*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: valar99@mail.ru*

[2] *ООО "Мерке", 143980, Московская обл., г. Железнодорожный, ул. Советская, д. 46; e-mail: v.yankovskaya@gmail.com*

[3]*ФГБУ Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства, 188514, пос. Ропша Ленинградской области, Стрельнинское шоссе, д. 4; e-mail: ropshatrout@yandex.ru*

[4]*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: makhrov12@mail.ru*

В работе изучено генетическое разнообразие всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений РФ (форель Дональдсона, форель Камлоопс, лосось стальноголовый, "Рофор", "Росталь", "Адлер" и "Адлерская янтарная") по шести микросателлитным локусам (*Ssa197, Ssa408, Omy1001, Omy1300, Omy1212* и *One111*). Гетерогенность частот аллелей всех изученных локусов между породами была высоко значима ($p<0.001$). Несмотря на то, что большинство аллелей микросателлитных локусов являются общими для всех пород радужной форели, в генофонде практически каждой из них имеются аллели, характерные только для этой породы или для группы пород. Полученные данные могут быть использованы для решения практических задач: определения принадлежности конкретной рыбы к той или иной породе, мониторинга генетического разнообразия, выявления триплоидов. Кроме того, генетическая дифференциация пород радужной форели отражает особенности начальных этапов эволюционного процесса, происходящего в ходе формирования новой популяции, а потому сведения такого рода могут быть полезны при построении эволюционных моделей.

Ключевые слова: микросателлиты, генетическая паспортизация, чужеродные виды, микроэволюция, доместикация, радужная форель, микижа, породы.

ВВЕДЕНИЕ

Радужная форель — основной объект форелеводства. В 2012 г. в мире, по данным ФАО (ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf), было выращено 878 702 тонн радужной форели, а в России в этом же году — 25 000 т (Захаров, 2013). В связи с этим, изучение генофонда пород радужной форели имеет важное практическое значение. Ведь наблюдаемое генетическое разнообразие — это, с одной стороны, результат работы селекционеров, а с другой — резерв для дальнейшей селекционной работы, которая, несомненно, будет востребована в связи с тем, что форелеводство развивается, в том числе, и в тех районах, для которых существующие породы радужной форели адаптированы не были.

Целью настоящей работы было изучение генетического разнообразия по микросателлитным локусам всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений Российской Федерации. Такая работа представляется исключительно актуальной в связи с тем, что наличие молекулярно-генетических паспортов на выращиваемые породы входит в "Минимальные требования, предъявляемые к селекционно-генетическому центру по разведению карпа, осетровых рыб, радужной форели, пеляди, растительноядных рыб" (приложение 18 к "Правилам в области племенного животноводства «Виды организаций, осуществляющих деятельность в области племенного животноводства»", утвержденным приказом № 431 Минсельхоза России от 17 ноября 2011 г.).

Однако изучение генетического разнообразия пород радужной форели имеет большое значение и для фундаментальной науки. Это связано, в первую очередь, с тем, что лососевые рыбы уже давно стали модельным объектом для исследований по эволюционной генетике (монографии: Глубоковский, 1995; Алтухов и др., 1997; Фролов, 2000; Hendry, Stearns, 2004). Кроме того, одомашнивание со времен Ч. Дарвина (Дарвин, 1941) служило моделью эволюции.

Например, есть все основания полагать, что изучение генофонда радужной форели будет способствовать раскрытию причин ее хорошо развитой способности к формированию новых популяций, поскольку данные последних лет показывают, что высокая способность к расселению связана с определенными генетическими особенностями вида (обзор: Орлова, 2011). Очевидно, что для поиска закономерностей такого рода радужная форель подходит как нельзя лучше: не случайно она попала в список наиболее опасных инвазионных видов (Lowe et al., 2004). При проникновении этого вида в водоемы за пределами естественного ареала (обзоры: Crawford, Muir, 2008; Stanković et al., 2015) в 88% случаев происходило изменение экосистем.

По этому показателю радужная форель лидирует среди всех изученных водных организмов (обзор: Garcia-Berthou et al., 2005).

Таким образом, в изучении совокупного генетического потенциала всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений РФ, и выявлении генетических особенностей каждой из них заинтересованы специалисты самых разных областей науки и производства.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Распространение радужной форели и ее внутривидовое разнообразие. Начиная с публикации работы (Smith, Stearley, 1989) в зарубежной литературе и некоторых отечественных изданиях радужную форель относят к роду *Oncorhynchus*, однако исследования разного рода, в том числе, генетические, показывают, что радужная форель достаточно далеко дивергировала от типичных представителей этого рода (подробности см.: Зелинский, Махров, 2001; Павлов и др., 2001). По этой причине в отечественной литературе для вида принято название *Parasalmo mykiss*.

Ареал радужной форели простирается вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки от северной Мексики до Аляски. Она встречается также на российском Дальнем Востоке — на Камчатке и Шантарских островах, а также единично обнаруживается в водоемах материкового побережья Охотского моря, в Амурском лимане и на Командорских островах; в России жилую форму радужной форели называют микижей, проходную — камчатской семгой (монографии: Павлов и др., 2001; Behnke, 2002).

Этот вид отличается высокой пластичностью и представлен целым рядом форм, некоторые из которых ранее считались самостоятельными видами. Мы акцентируем внимание только на тех из них, которые в разное время были использованы в аквакультуре и являются родоначальниками современных пород радужной форели. В первую очередь, это проходная форма — стальноголовый лосось, а также жилые формы радужной форели, исходно обитавшие в реках Запада США. В водоемах тихоокеанского побережья Канады обитает пресноводная форель Камлоопс, которая отличается от других форм радужной форели тем, что эта форма является осенненерестующей, в то время как для всех прочих форм характерен весенний нерест (Keeley et al., 2005; Stephens, 2007).

Большая часть радужной форели, выращиваемой в условиях аквакультуры, ведет свое начало от рыб, одомашненных в 1870-х гг. на базе рыбоводного хозяйства, располагавшегося на р. МакКлауд (McCloud) в Калифорнии. Происхождение первых рыб, которых начали разводить искусственно, точно неизвестно, однако, судя по всему, их родоначальниками была не только жилая форма радужной форели, но и стальноголовый лосось (Needham, Behnke, 1962). В настоящее время в мире насчитывается десятки пород радужной форели. Селекцию этих пород вели по таким хозяйственно-важным признакам как темп роста, возраст и сезон созревания, плодовитость, гонадосоматический индекс, форма тела, а также по фенам окраски.

В Россию радужную форель завозили неоднократно, причем из разных стран — Германии, Дании, Чехословакии и др. (Породы радужной форели …, 2006). Так, в 1965–1970 гг. в СССР из США была импортирована икра стальноголового лосося (Шатуновский и др., 1970). Кроме того, в 1982 году в нашу страну была завезена форель Дональдсона, полученная в США Л.Р. Дональдсоном в результате 40-летней селекции, а также форель Камлоопс (Титарев, 1988).

В результате гибридизации радужной форели со стальноголовым лососем и последующей селекции (в первую очередь, на раннее созревание) на базе рыбоводного хозяйства “Адлер” (ныне ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”») была получена отечественная порода форели “Адлер”, которая в 1997 году была утверждена в качестве селекционного достижения (Никандров и др., 2002).

Еще одной породой, полученной в России путем гибридизации рыб разного происхождения с последующей селекцией, стала порода “Рофор”, выведенная во ФГУП “Федеральный селекционный государственный центр рыбоводства” (пос. Ропша). Эта порода была утверждена в качестве селекционного достижения в 1999 г. (Породы радужной форели …, 2006).

Во ФГУП “ФСГЦР” создана также отечественная порода “Росталь”, исходным материалом для выведения который послужил стальноголовый лосось. Эта порода происходит всего от одной пары тщательно отобранных производителей (Терентьева, 1995). Она была утверждена в качестве селекционного достижения в 2002 году (Породы радужной форели …, 2006).

Происхождение рыб, завезенных в Адлер с Чегемского рыбоводного завода, и послуживших основой для выведения отечественной породы “Адлерская янтарная”, проследить не удалось. При выведении этой породы на базе ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”» селекцию вели, в первую очередь, с целью закрепления фенов окраски, соответствующих цветовой гамме природного янтаря.

Этот тип окраски оказался кодоминантным. Порода “Адлерская янтарная” была зарегистрирована в качестве селекционного достижения в 2003 году (Шиндавина и др., 2005).

В 2015 г. в “Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию” (http://www.gossort.com/docs/rus/REESTR_SKOT2015.pdf) фигурируют три породы радужной форели зарубежного происхождения — форель Дональдсона (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ФГУП ПФЗ “Чегемское”), форель Камлоопс (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ФГУП ПФЗ “Чегемское”) и лосось стальноголовый (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ЗАО СПЗ “Форелевый”). В нем значатся также две отечественные породы — “Рофор” и “Росталь” — созданные на базе ФГУП “ФСГЦР” и две — “Адлер” и “Адлерская янтарная” — созданные на базе ФГУП «ПФЗ “Адлер”». Всего на территории России в настоящее время существуют племенные маточные стада семи пород радужной форели.

Генетические маркеры радужной форели и их пригодность для идентификации пород. В отличие от пород рогатого скота, пушных зверей и кур, генетические характеристики которых интенсивно изучаются (монографии: Генофонды сельскохозяйственных животных …, 2006; Глазко и др., 2012), изучение генофонда пород рыб, в частности лососевых, только начинается. На этом этапе очень важно выбрать адекватные методики, позволяющие диагностировать породы и оценивать генетическое разнообразие внутри них.

Метод **хромосомного анализа** не может использоваться для генетической паспортизации, ввиду того, что он очень трудоемок и не обладает необходимой степенью разрешения, хотя хромосомный полиморфизм у радужной форели отмечали неоднократно (Colihueque et al., 2001; обзор: Зелинский, Махров, 2001).

Первоначально для генетической паспортизации пород радужной форели применяли **аллозимный анализ**, и в ряде случаев различия между породами форели по частотам аллелей аллозимов действительно были найдены (Busack et al., 1979; Guyomard, 1981; Kincaid, 1981; Thompson, 1985; Koljonen, 1986; Паавер, 1988; Nakajima, Fujio, 1988; van der Bank et al., 1992; Wangila, 1994; Winkler et al., 1995; Породы радужной форели …, 2006). Однако разрешающая способность данного метода была явно недостаточной: значимые различия между тестируемыми породами удавалось обнаружить далеко не всегда, и только по некоторым локусам. При этом породную принадлежность не выборки, а каждой конкретной особи определить обычно не представлялось возможным.

Более того, различия того же порядка были обнаружены не только между породами, но и между выборками форели Дональдсона, выращиваемой в отечественных хозяйствах, расположенных в разных регионах (в Ропше и в Адлере) (Породы радужной форели…, 2006, с. 71, с. 226). Трудно сказать, повлиял ли на этот результат процесс отбора на устойчивость к конкретным условиям выращивания или имели место случайные процессы в одной или обоих линиях, однако ясно, что в данном случае характеристика двух маточных стад по аллозимам не позволяет продемонстрировать их большую близость друг к другу, чем к маточным стадам других пород радужной форели. Таким образом, аллозимный анализ не позволил в данном случае получить адекватную характеристику породы.

С тех пор, как были развиты более чувствительные методы молекулярно-генетического анализа (основанные на анализе ДНК), аллозимный анализ все реже используется на практике. Это связано отчасти с тем, что при сборе образцов требуется их глубокая заморозка (-70ºС), что не всегда осуществимо. К тому же подавляющее большинство полиморфных аллозимных локусов представляют собой двух- или трехаллельные системы, а столь небольшое число аллелей требует, как правило, чрезвычайно больших выборок (сотни экземпляров) для регистрации тонких различий между популяциями или селекционируемыми линиями. Между тем, изъятие сотен особей неприемлемо в условиях племенного хозяйства.

К числу достоинств аллозимного анализа относится то, что он базируется на полиморфизме белков, которые всегда имеют вполне определенную функцию в клетке и организме в целом, а значит, могут попадать под действие отбора непосредственно (монография: Глазко, Созинов, 1993).

В то же время, следует отметить, что селекция пород лососевых рыб происходила, как правило, не по одному, а по целому комплексу критериев одновременно (например, учитывался возраст созревания, гонадо-соматический индекс и время начала нереста). Кроме того, в разных племенных хозяйствах селекция часто шла в одном и том же направлении, но благодаря разному исходному материалу и различию в условиях содержания полученные породы рыб отличались друг от друга.

Таким образом, при характеристике пород лососевых рыб методами аллозимного анализа мы вправе ожидать, в основном, сужения

генетического разнообразия за счет утраты редких аллелей, присутствовавших в исходном материале. Наиболее низкий уровень генетического разнообразия методами аллозимного анализа был зарегистрирован у форели Дональдсона, которая хорошо отличается генетически от других линий, разводившихся в СССР (Паавер, 1988). В то же время, вряд ли можно надеяться найти качественные различия между породами радужной форели в виде фиксации у них разных аллелей аллозимных локусов — по крайней мере, на современном этапе селекционного процесса у рыб.

Появлялись указания на различия между породами радужной форели, обнаруженные методом **RAPD-PCR** (Барминцев и др., 2003; Bogue rouk et al., 2007; Сексте и др., 2008). Между некоторыми породами были найдены различия с помощью **фингерпринтинга** (разновидность рестриктного анализа) ДНК (Белаш и др., 2003; Терлецкий и др., 2004; Дементьева и др., 2005). Однако, методы анализа, основанные на сопоставлении длин случайных последовательностей генома, не отличаются высокой степенью надежности и зачастую плохо воспроизводимы, поэтому широкого распространения они не получили.

Число гаплотипов **митохондриальной ДНК** даже в природных популяциях лососевых обычно невелико, поэтому использовать этот признак для идентификации пород в целом нецелесообразно. Отметим, однако, что между линиями радужной форели в некоторых случаях наблюдались значительные различия в частотах гаплотипов мтДНК (Palva, Palva, 1987; Danzmann et al., 1993; Sajedi et al., 2003).

В последние годы для генетических исследований радужной форели предложено использовать еще один тип маркеров — **SNP-маркеры** (single nucleotide polymorphism), которые представляют собой точечные мутации в ядерной ДНК (Sprowles et al., 2006; Campbell et al., 2009; Stephens et al., 2009; Abadía-Cardoso et al., 2013; Palti et al., 2015; Liu et al., 2016). Эта группа маркеров, безусловно, весьма перспективна, не в последнюю очередь, потому, что работа с ними может быть автоматизирована и стандартизирована.

Однако, работы, в которых представлены сравнительные характеристики различных пород и селекционных линий лососевых рыб в настоящее время базируются во всем мире, преимущественно, на **анализе микросателлитов**, что обусловлено рядом объективных причин.

Эти маркеры исключительно высокополиморфны. Среднее число аллелей на микросателлитный локус составляет в природных популяциях лососевых рыб 10–20 аллелей, но в некоторых случаях может доходить до 50 и более (обзор: Артамонова, Махров, 2015).

Кроме того, использование маркеров данного типа (как и анализ митохондриальной ДНК) допускает прижизненное тестирование особей: для получения ДНК достаточно небольшого фрагмента плавника или нескольких чешуй рыбы. Пробы могут быть надежно фиксированы в полевых условиях и имеют почти неограниченный срок хранения — ДНК удается получать из сухой чешуи или коллекционных экземпляров, фиксированных этанолом, даже спустя десятки лет (Nielsen et al., 1997).

Данный метод является самым высокочувствительным среди всех перечисленных выше (возможно, за исключением SNP). Он хорошо работает в тех случаях, когда требуется различать генетически близкие группы организмов (в том числе, различные породы) и позволяет надежно устанавливать родство особей, поскольку сочетание генотипов для разных микросателлитных локусов является, как правило, уникальным для организма (обзор: Avise, 2004). При этом 12–23% микросателлитных локусов оказываются сцепленными с генами, находящимися под отбором (Vasemagi et al., 2005б), а значит, вероятность выявления различий между породами рыб по микросателлитным локусам достаточно высока.

Имеющиеся в настоящее время литературные данные, как правило, недостаточны, чтобы сделать вывод о том, является ли данный конкретный локус селекционно-нейтральным или может находиться под отбором. Известно, однако, что такие популярные у исследователей локусы, как, например, *Ssa197* и *Ssa171*, используемые при изучении популяций атлантического лосося, радужной форели и других лососевых рыб, находятся под отбором достаточно часто (Spidle et al., 2003; Vasemagi et al., 2005а). Новые факты, касающиеся отбора по таким локусам в процессе селекции, могут вывести на сцепленные с ними гены, отвечающие за хозяйственно-важные признаки.

Микросателлиты успешно использовали для дифференциации природных популяций радужной форели (микижи), включая популяции российской части ареала (McPhee et al., 2007; Семенова и др., 2010; Павлов и др., 2011), а также для оценки генетического разнообразия разводимых рыб, различения заводских и диких рыб, идентификации отдельных семей (ссылки см.: Артамонова, Махров, 2015).

Различия между некоторыми породами радужной форели в частотах аллелей микросателлитных локусов показаны в ряде работ (Бар-

минцев и др., 2003; Ward et al., 2003; Silverstein et al., 2004; Zhao et al., 2006, 2008; Boguerouk et al., 2007; Gross et al., 2007; Glover, 2008). Особо следует отметить работу эстонских исследователей (Gross et al., 2007), где показано, что анализ микросателлитов позволяет определять принадлежность конкретной особи к той или иной породе с точностью от 63 до 100%.

Пока еще каждая исследовательская группа использует свой набор микросателлитных локусов, однако нет сомнений, что в самое ближайшее время набор маркеров, используемых при идентификации пород лососевых рыб, будет стандартизирован.

Предпосылки для стандартизации набора маркеров при генетической идентификации пород лососевых рыб. Изучение разнообразия и особенностей наследования генетических локусов у лососевых в настоящее время значительно упрощается, поскольку для радужной форели не так давно были построены подробные карты сцепления (Nichols et al., 2003; Guyomard et al., 2006). В сумме на этих картах локализованы положения более 2 000 различных генетических маркеров. Среди картированных локусов 29 известных генов, 4 аллозимных и 12 минисателлитных локусов, 38 SINE-маркеров, а также 72 VNTR-, 5 RAPD-, 799 EcoRI AFLP-, 174 PstI AFLP-маркера. Определены позиции почти 1000 микросателлитов.

При помощи гибридизации *in situ* карты групп сцепления соотнесены с хромосомами радужной форели, и установлено, что всего геном этого вида насчитывает 31 группу сцепления, среди которых 21 метацентрическая и 10 акроцентрических (Guyomard et al., 2006).

Характерно, что в числе микросателлитных маркеров картированы не только локусы, обнаруженные непосредственно у радужной форели, но и микросателлиты, выявленные первоначально у атлантического лосося, кумжи, нерки, кеты, чавычи, кижуча. Относительно целого ряда микросателлитных маркеров уже известно, что они присутствуют в геномах и полиморфны сразу у нескольких видов лососей (Rexroad III et al., 2002; Paterson et al., 2004).

Особенности хромосомной локализации генетических маркеров следует учитывать при выборе спектра тестируемых локусов, используемых для идентификации пород рыб: эти локусы должны представлять, по возможности, разные хромосомы, в том числе и половые. Кроме того, набор маркеров должен быть, в основном, унифицирован и пригоден для использования на разных видах лососей. Поэтому для идентификации пород желательно подбирать локусы, полиморфные сразу у нескольких видов.

Статистические оценки говорят о том, что степень дифференциации популяций по микросателлитным локусам чрезвычайно высока, и для уверенной (около 95%) идентификации принадлежности особи к той или иной выборке обычно достаточно проанализировать 30–50 рыб по 6–8 микросателлитным локусам (O'Connell, Wright, 1997; Hansen et al., 2001; Rengmark et al., 2006). При этом для выявления генетических особенностей породы как целого достаточно тестирования около 30–50 особей по 4–5 микросателлитным локусам.

И, наконец, при отборе генетических локусов, которые целесообразно включить в стандартный набор для идентификации пород лососевых рыб, следует принять во внимание, что в недалеком будущем эти сведения будут активно использоваться в рыбоводной практике, селекции, с целью охраны селекционных достижений. В связи с этим, методика генетического анализа для стандартного набора локусов должна быть единой и максимально простой: желательно, чтобы используемые праймеры имели одинаковую температуру отжига, а диапазон аллельных вариантов каждого локуса располагался в пределах от 90 до 350 п.н.

Это последнее обусловлено необходимостью уверенного распознавания отдельных аллелей микросателлитов при тестировании проб не только при капиллярном электрофорезе, но и на коротких (18–20 см) полиакриламидных гелях, поскольку приборы для капиллярного электрофореза и флуоресцентно меченые праймеры относительно дороги и пока не могут использоваться при массовых исследованиях. С той же целью (уверенное распознавание аллелей) следует отдавать предпочтение три- и тетрануклеотидным локусам перед динуклеотидными. Предпочтение тетрануклеотидных локусов целесообразно еще и с той точки зрения, что, в среднем, их вариабельность выше, чем у динуклеотидных, примерно в два раза (O'Reilly et al., 1996, Garant et al., 2000).

Разумеется, набор микросателлитных локусов, используемых для идентификации пород лососевых рыб, может несколько варьировать от вида к виду, или постепенно меняться с течением времени при появлении новых данных, например, о характере отбора по некоторым маркерам. Тем не менее, получение уже сейчас генетических характеристик пород лососевых рыб на основе изучения разнообразия по ряду общих локусов, будет в значительной мере способствовать прогрессу в селекции и создаст фундамент для охраны селекционных достижений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал, использованный для генетического анализа маточных стад радужной форели. В 2008–2009 гг. в двух хозяйствах — оригинаторах (ФГУП "ФСГЦР" (пос. Ропша) и ФГУП «Племенной форелеводческий завод "Адлер"») был собран биологический материал от особей семи пород радужной форели, официально зарегистрированных в Российской Федерации в качестве селекционных достижений. Образцы, из которых получали ДНК для микросателлитного анализа, представляли собой фрагменты жировых плавников рыб (в случае породы "Росталь" — грудных плавников), фиксированных 96% этанолом в соотношении 1:5. Особенности материала, использованного для паспортизации маточных стад радужной форели, представлены в таблице 1. Во всех случаях биологический материал был получен не менее чем от 50 самцов и 50 самок каждой породы.

Таблица 1. Характеристика биологического материала, использованного для паспортизации маточных стад радужной форели

Порода	Хозяйство	Пол и возраст рыб, используемых для паспортизации пород
Стальноголовый лосось	ФГУП ПФЗ "Адлер"	самки 4. (январь 2008 г.) самцы 2. и 3. (январь 2008 г.)
Адлерская янтарная	ФГУП ПФЗ "Адлер",	самки 4. (январь 2008 г.) самцы 2. (январь 2008 г.)
Адлер	ФГУП ПФЗ "Адлер"	самки 2. (январь 2008) самцы 2. (февраль 2008)
Форель Дональдсона	ФГУП ПФЗ "Адлер"	самки 2. (февраль 2008 г.) самцы 2. (февраль 2008 г.)
Камлоопс	ФГУП ПФЗ "Адлер"	самки 1+ (март 2008 г.) самцы 1+ (март 2008 г.)
Рофор	ФГУП "ФСГЦР"	самки 5. (февраль 2009 г.) самцы 4. (февраль 2009 г.)
Росталь	ФГУП "ФСГЦР"	самки 5. (февраль 2009 г.) самцы 4. (февраль 2009 г.)

Амплификация фрагментов ДНК исследуемых локусов. При выделении тотальной клеточной ДНК использовали метод фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Синтез фрагментов ДНК (полимеразную цепную реакцию — ПЦР), представляющих собой исследуемые микросателлитные локусы, проводили на амплификаторе ТП-2-24 (Производство ООО "Тульская диагностическая лаборатория") в 25 мкл буфера для амплификации фирмы "Fermentas": 10 мМ Трис-HCl (pH 8.8); 50 ммоль KCl; 2,0 ммоль $MgCl_2$; 0.08% Nonidet P40.

Амплификационная смесь содержала 100-300 нг тотальной клеточной ДНК, по 10 пмоль каждого из двух праймеров (прямого (a) и обратного (b)) для соответствующего локуса, по 200 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0,5 ед. Taq-полимеразы (производство фирмы "Бионем", Москва). Сверху, для предотвращения испарения в ходе ПЦР, на смесь наслаивали минеральное масло.

С целью унификации условий проведения микросателлитного анализа, для всех микросателлитных локусов применяли единую стандартную программу амплификации, которая включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК — 4 мин., +95°C; 35 циклов синтеза фрагмента ДНК: +95°C — 60 сек, +58°C — 50 сек, 72°C — 50 мин, а также этап достройки концов фрагмента: +72°C, 5 мин.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Анализ длин фрагментов микросателлитных локусов проводили в 6.5–7% полиакриламидном геле в Трис-боратном буфере (89 ммоль Трис-борат, 89 ммоль борная кислота, 2 ммоль ЭДТА pH 8.0) в камере VE-3 для вертикального электрофореза фирмы «Хеликон» (Москва). Эталонными образцами длин фрагментов ДНК служили двунитевые маркеры фирмы «Promega» с шагом 50 пар нуклеотидов в диапазоне от 50 до 800 пар оснований и с шагом 25 пар нуклеотидов в диапазоне от 25 до 300 пар оснований (+ дополнительные фрагменты длиной 1800 п.н. и 800 п.н. соответственно).

После предварительного определения набора аллелей для каждого микросателлитного локуса, при последующих электрофорезах наряду с маркерами «Promega» на гель наносили также стандарты, которые готовили путем смешивания 2–5 ранее тестированных образцов. Образцы подбирали таким образом, чтобы в смеси оказался представлен максимально полный для данного локуса набор аллелей. Этот прием позволял провести сопоставление аллелей, обнаруженных у разных пород, друг с другом, а также более точно определить их подвижности. Кроме того, данный прием позволял уверенно выявлять новые аллели, не представленные в стандарте (рис. 1).

Для визуального наблюдения за ходом электрофореза в лунки геля вместе с пробами наносили смесь красителей бромфенолового синего и ксиленцианола. Смесь красителей (по 0.03%), готовили на 40% сахарозе, содержащей 100 mM Трис-HCl, pH 7.8. Объем смеси красителей составлял около 1/6 от объема пробы.

Электрофорез проводили при напряжении 240–280 V и силе тока 60–100 mA, до прохождения красителем ксиленцианолом расстояния, составляющего около ¾ длины геля (около 15 см, ~3.5 часа).

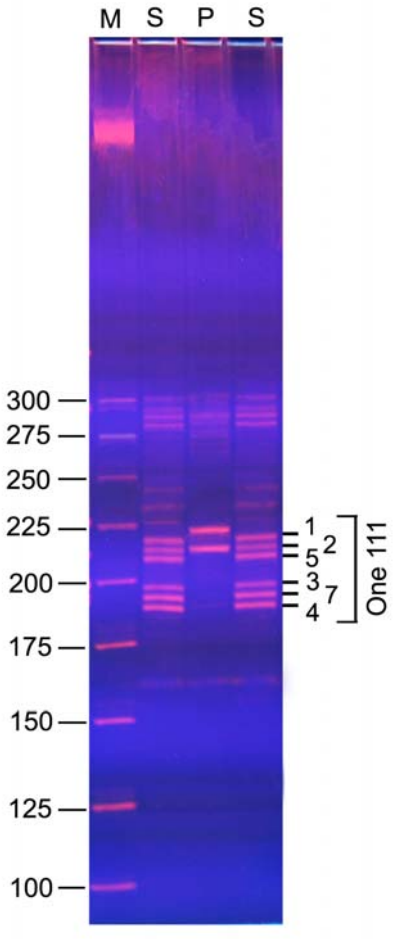


Рис. 1. Выявление нового аллеля (6) локуса *One111* путем сравнения подвижности ПЦР-продуктов анализируемой пробы (лунка P) со стандартом (лунки S), содержащим известные ранее аллели (обозначены цифрами 1–5, 7 справа). Сравнение показывает, что анализируемая особь гетерозиготна по локусу *One111* и содержит в своем геноме известный ранее аллель 2 и не обнаруживавшийся прежде аллель 6. M — маркер длины с шагом 25 п.н. Цифрами слева обозначены длины фрагментов использованного маркера (п.н.).

Регистрация результатов микросателлитного анализа в полиакриламидных гелях. После электрофореза полиакриламидные гели окрашивали раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл, 5–15 мин.), промывали в дистиллированной воде (10–15 мин.) и фотографировали в ультрафиолете (λ=254 нм) цифровой камерой “Canon” (PowerShot A620). Полученные изображения заносили в компьютерную базу данных. Длины микросателлитов определяли с использованием компьютерной программы Gel Analysis(Ru).

Фрагментный анализ. Для того чтобы результаты микросателлитного анализа в полиакриламидном геле можно было в дальнейшем сопоставлять с данными, получаемыми в ходе капиллярного электрофореза, был выполнен фрагментный анализ микросателлитов. Фрагментный анализ проводили выборочно, таким образом, чтобы в тестируемых образцах были представлены все аллельные варианты каждого из локусов, выявленные предварительно путем электрофореза в полиакриламидных гелях.

С этой целью проводили амплификацию микросателлитов с выбранных образцов ДНК используя в качестве прямого праймера праймер (F), меченый флуоресцентным красителем FAM. Во всем остальном процесс амплификации был таким же, как описано выше. По окончании амплификации ПЦР-продукты переосаждали в мягких условиях (комнатная температура, 20 мин.), добавляя к пробе, предварительно извлеченной из-под минерального масла, этанол до конечной концентрации 70% и ацетат аммония до конечной концентрации 125 мМ. Осадок ПЦР-продукта формировали центрифугированием (центрифуга Eppendorf 5415, 13 000 оборотов/мин., +20°C, 20 мин.), спиртовой раствор сливали. Осадок промывали 500 мкл 70% этанола в течение 20 мин., пробу центрифугировали (центрифуга Eppendorf 5415, 13 000 оборотов/мин., +20°C, 10 мин.), спирт удаляли

водоструйным насосом. Осадок подсушивали в термостате при Т=+50°С и растворяли в деионизованной воде, в объеме, равном первоначальному объему пробы.

Каждую аликвоту полученного раствора разводили формамидом в 150 раз и 20 мкл этого раствора вносили в лунку планшета, куда добавляли также по 0.5 мкл раствора флуоресцентного маркера, согласно рекомендациям производителя (Fluorescent Ladder (CXR), 60–400 bases, Promega). Анализ проводили на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems на базе Межинститутского Центра коллективного пользования "Геном" ИМБ РАН. Результаты фрагментного анализа визуализировали и регистрировали с использованием компьютерной программы GeneMarker, v.1.95 (www.softgenetics.com).

Изученные микросателлитные локусы. На основании анализа литературных данных для первого этапа генетической паспортизации маточных стад были выбраны 10 микросателлитных локусов, характеристики которых представлены в таблице 2. Праймеры к этим локусам (табл. 3) были синтезированы на базе биотехнологической компании "Евроген".

Таблица 2. Микросателлитные локусы лососевых рыб, изученные в работе. Литературные источники указаны в табл. 3

Локус и его локализация у радужной форели	Диапазон изменчивости (лит. данные)	Число аллелей (лит. данные)	Число аллелей (эксп.)*	Повторяющийся элемент локуса
SSsp1605	213-305	14	1	(GTTA)25
SSsp2213	151-191	13	1	(GTTA)22
Ssa85 (хромосома 24)	110-138	14	_	(GT)14
Ssa197 (хромосома 21)	131-203	19	3	(GT)5C(TG)4TC(TG)3 A(GTGA)15
Ssa202	267-320	16	_	(CA)3(CTCA)17
Ssa408 (хромосома 1, половая)	176-304	28	11	(GACA)37
Omy1001 (хромосома 18)	176-241	12	10	(CTGT)2…(GTCT)2… (GTCT)2…(GTCT)15
Omy1300 (хромосома 31)	207-275	15	5	(ATCT)10
Omy1212 (хромосома 12)	208-291	22	5	(GACA)13…(GACA)14
One111 (хромосома 10)	194-322	30	8	(TAGA)21

* — число аллелей, найденных экспериментально, указано по совокупности всех изученных пород радужной форели.

Таблица 3. Праймеры к микросателлитным локусам, использованным в работе

Локус и его локализация у радужной форели	Праймеры	Литературный источник
SSsp1605	(F)GGCCCAGACAGATAAACAAACACGC (R)GCCAACAGCAGCATCTACACCCAG	Paterson et al., 2004
SSsp2213	(F)ATGTGGAGGTCAACTAACCAGCGTG (R)CATCAATCACAGAGTGAGGCACTCG	Paterson et al., 2004
Ssa85 (хромосома 24)	(a)AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC (b)ACCCGCTCCTCACTTAATC	O'Reilly et al.,1996
Ssa197 (хромосома 21)	(a)GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG (b)TGGCAGGGATTTGACATAAC	O'Reilly et al.,1996
Ssa202	(a)CTTGGAATATCTAGAATATGGC (b)TTCATGTGTTAATGTTGGCGTG	O'Reilly et al.,1996
Ssa408 (хромосома 1, половая)	(a)TGTGTAGGCAGGTGTGGAC (b)CACTGCTGTTACTTTGGTGATTC	Cairney et al., 2000
Omy1001 (хромосома 18)	(a)GATTCCATAACCTCGCCTTC (b)GTCCTTGTGCTGCCTGCT	Spies et al., 2005
Omy1300 (хромосома 31)	(a)CATGGAGAAAAGACCAATCA (b)TCACTGCCCTACAACAGAAG	Olsen et al., 2000
Omy1212 (хромосома 12)	(a)ACTCACCTAACCCTGTCAGCAATG (b)TGAAAGGGATGGGTTATTATACAGCCC	Spies et al., 2006
One111 (хромосома 10)	(a)ATGACCAAGGAGCTTCTGC (b)TATCCAGGTACTCCACTGGC	Olsen et al., 2000

Согласно литературным данным, все выбранные локусы являются высокополиморфными у радужной форели и все, за исключением локуса *Ssa85*, относятся к числу тетрануклеотидных. Для всех локусов, использованных в работе, диапазон варьирования длин фрагментов ДНК, представляющих собой различные аллели, находится в пределах 110–325 п.н., то есть выбранные микросателлитные локусы могут быть тестированы с высокой степенью надежности на коротких полиакриламидных гелях, без применения дорогостоящего оборудования.

Для большинства локусов, исследованных в работе, известно их положение на хромосомах в геноме радужной форели; данные по локализации конкретных микросателлитов также представлены в таблице 2.

Статистическая обработка результатов. Для трех локусов — *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*, с использованием компьютерной программы TFPGA (Miller, 1997), были сделаны оценки частот аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Кроме того, были получены данные по соответствию распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга, оценены генетические дистанции между выборками, построены дендрограммы (по: Nei, 1978). Сравнение частот аллелей в выборках проводили на основании критерия χ^2 и метода Монте-Карло (Roff, Bentzen, 1989) с использованием программы CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993). При обработке данных и построении диаграмм использовали компьютерные программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования оказалось, что для локусов *Ssa85* и *Ssa202*, разработанных первоначально для атлантического лосося, при стандартных условиях амплификации, принятых в данной работе, получить ПЦР-продукт, пригодный для анализа с достаточной степенью точности, не удается.

Хотя было очевидно, что данные локусы являются полиморфными, и, изменив условия амплификации, можно получить ПЦР-продукт более высокого качества, мы исключили их из последующего анализа, руководствуясь тем, что для целей практического использования данных, представленных в генетическом паспорте, целесообразно соблюсти единство методики для всех локусов.

Локусы *SSsp2213* и *SSsp1605* были мономорфными у радужной форели и позволяли отличать особей этого вида от другого вида лососевых рыб — кумжи (*Salmo trutta*). Было показано, что в обоих случаях выбранные локусы могут быть амплифицированы с использованием стандартной программы амплификации, разработанной в рамках данной работы, и позволяют надежно определять видовую принадлежность рыб, а также выявлять межвидовых гибридов.

Для шести остальных полиморфных локусов радужной форели стандартные условия амплификации позволяли получать ПЦР-продукт высокого качества. Статус микросателлитных локусов *Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212* и *One111*, как локусов, полиморфных у радужной форели, подтвердился. При этом следует отметить, что данные об абсолютной длине фрагментов ДНК для всех этих локусов, полученные методом электрофореза в полиакриламидном геле и методом фрагментного анализа, друг с другом не совпадали. Для каждого локуса при пересчете данных одного вида анализа в данные для другого необходимо было вводить систематическую поправку, которая была для каждого локуса своей и составляла от 3 до 7 нуклеотидов, что связано с наличием вторичных структур внутри двунитевых фрагментов ДНК. Наличие вторичных структур сказывается на подвижности молекул при анализе длин фрагментов в неденатурирующих условиях (анализ в неденатурирующем полиакриламидном геле), и потому данные, полученные разными методами, сравнивать напрямую нельзя.

В таблице 2 приведены данные о числе аллелей, обнаруженных в настоящее время у рыб, принадлежащих к породам радужной форели, значащимся в Реестре селекционных достижений. Рисунки 2–7 иллюстрируют аллельное разнообразие микросателлитов, обнаруженных для локусов *Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212* и *One111*.

В качестве примера, наиболее подробно представлены данные по разнообразию трех микросателлитных локусов: *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*. В локусе *One111* зарегистрировано 8 аллелей, в *Ssa408* — 11 аллелей, в *Ssa197* — 3 (табл. 4). Что касается локуса *Ssa197*, то аллель 3 с подвижностью 76 п.н. встретился в гетерозиготном состоянии только у двух особей стальноголового лосося из 250, тестированных по данному локусу при проведении дополнительных исследований.

Распределение частот генотипов во всех выборках во всех случаях соответствует распределению Харди-Вайнберга. Наблюдаемая гетерозиготность в выборках приводится в таблице 4. Гетерогенность частот аллелей всех изученных локусов между породами была высоко значима (p<0.001). Различия в частотах аллелей при попарном сравнении выборок разных пород в большинстве случаев также были значимы (табл. 5). Генетические дистанции

между выборками представлены в таблице 5. Дендрограмма сходства изученных пород приведена на рисунке 8.

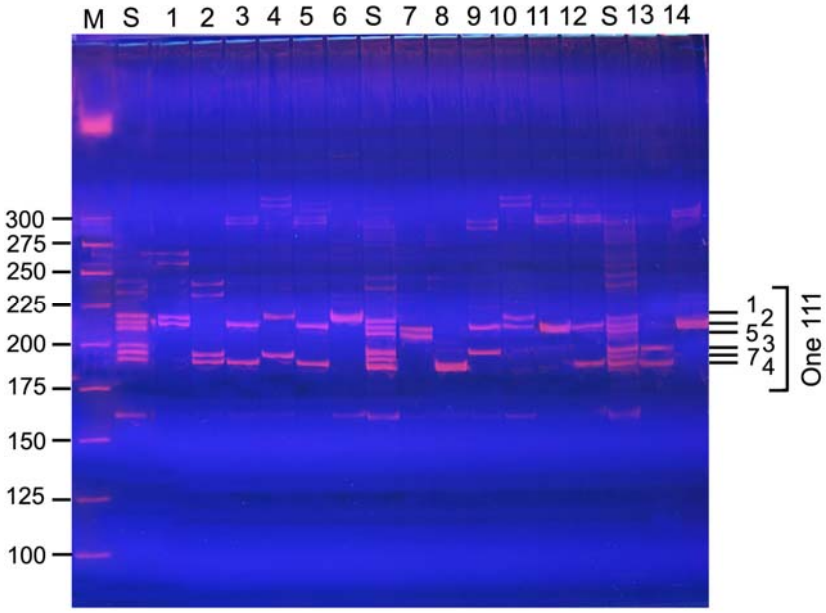


Рис. 2. Аллельное разнообразие по локусу *One111*. В составе стандарта (S) представлены аллели 1–5, 7 (обозначения аллелей указаны справа): 1 – 218 п.н., 2 – 214 п.н., 3 – 198 п.н., 4 – 190 п.н., 5 – 210 п.н., 7 – 194 п.н. Аллель 6 (222 п.н.) обнаружен у единственной особи породы “Рофор” (см. Рис. 1). Аллель 8 является 0-аллелем, присутствие которого надежно зарегистрировано только у одной особи форели Дональдсона. М – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов ДНК в составе маркера указаны слева (п.н.). Лунки 1–6 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК радужной форели породы “Росталь”; лунки 7–14 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК форели Дональдсона.

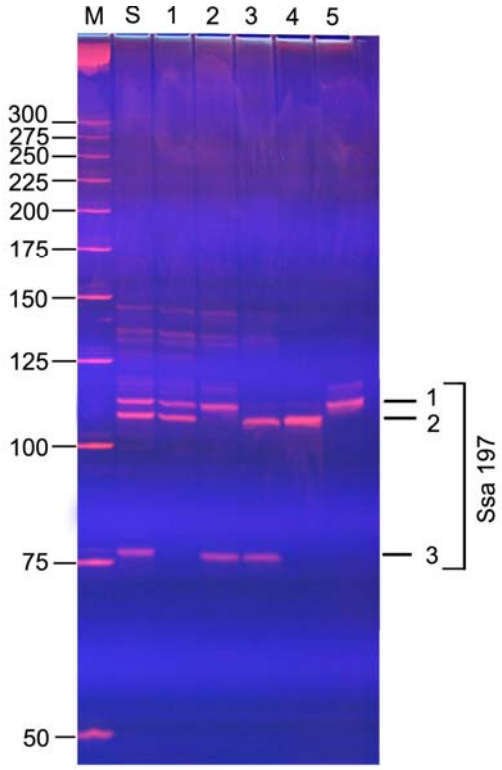


Рис. 3. Аллельное разнообразие по локусу *Ssa197*. В стандарте (S) представлены все 3 аллеля (обозначения аллелей даны справа), выявленные в маточных стадах семи исследованных пород радужной форели: 1 – 112 п.н., 2 – 108 п.н., 3 – 76 п.н. Аллель 3 встретился в гетерозиготном состоянии у двух особей стальноголового лосося из 250, тестированных по данному локусу дополнительно. У рыб других пород этот аллель выявлен не был. М – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов маркера указаны слева (п.н.). Лунки 1–5 – ПЦР-продукты, полученные с использованием образцов ДНК стальноголового лосося. Представлены все генотипы, наблюдавшиеся для локуса *Ssa197*.

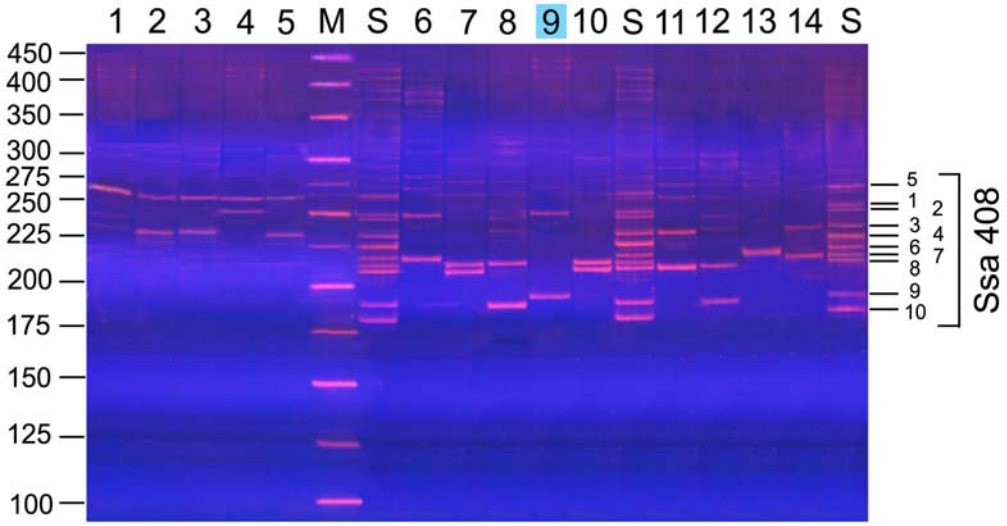


Рис. 4. Аллельное разнообразие по локусу *Ssa408*, расположенному в половой хромосоме радужной форели. В составе стандарта (S) представлены 10 аллелей (обозначения даны справа): 1 – 248 п.н., 2 – 244 п.н., 3 – 232 п.н., 4 – 224 п.н., 5 – 264 п.н., 6 – 216 п.н., 7 – 212 п.н., 8 – 208 п.н., 9 – 192 п.н., 10 – 184 п.н. Уникальный аллель 11 (196 п.н.) обнаружен у одной особи породы “Рофор” в гетерозиготном состоянии – лунка № 9. М – смесь маркеров с шагом 25 п.н. и 50 п.н. Длины фрагментов ДНК для маркеров указаны слева. Лунки 1–5 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Адлерская янтарная”; лунки 6-14 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Рофор”.

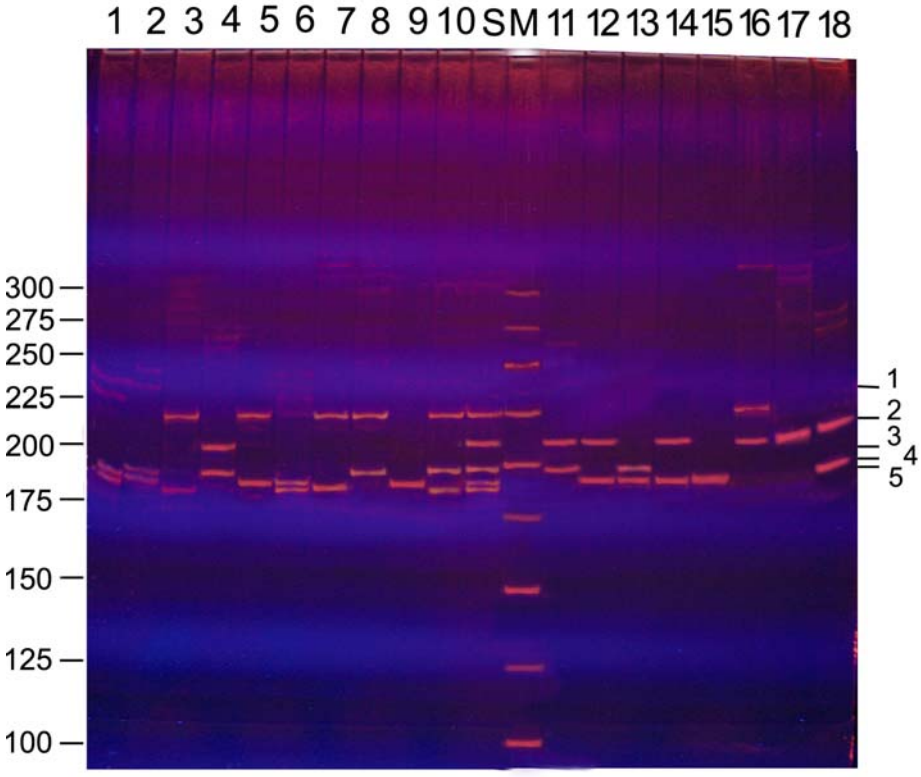


Рис. 5. Аллельное разнообразие по локусу *Omy1300*. Все аллели, выявленные у семи исследованных пород радужной форели, представлены в составе стандарта (S, нумерация аллелей – справа): 1 – 225 п.н., 2 – 209 п.н., 3 – 197 п.н., 4 – 193 п.н., 5 – 191 п.н. Лунки 1–10 – образцы стальноголового лосося; 11–18 – образцы форели Дональдсона; М – маркер длины с шагом 25 п.н., длины фрагментов маркера указаны слева.

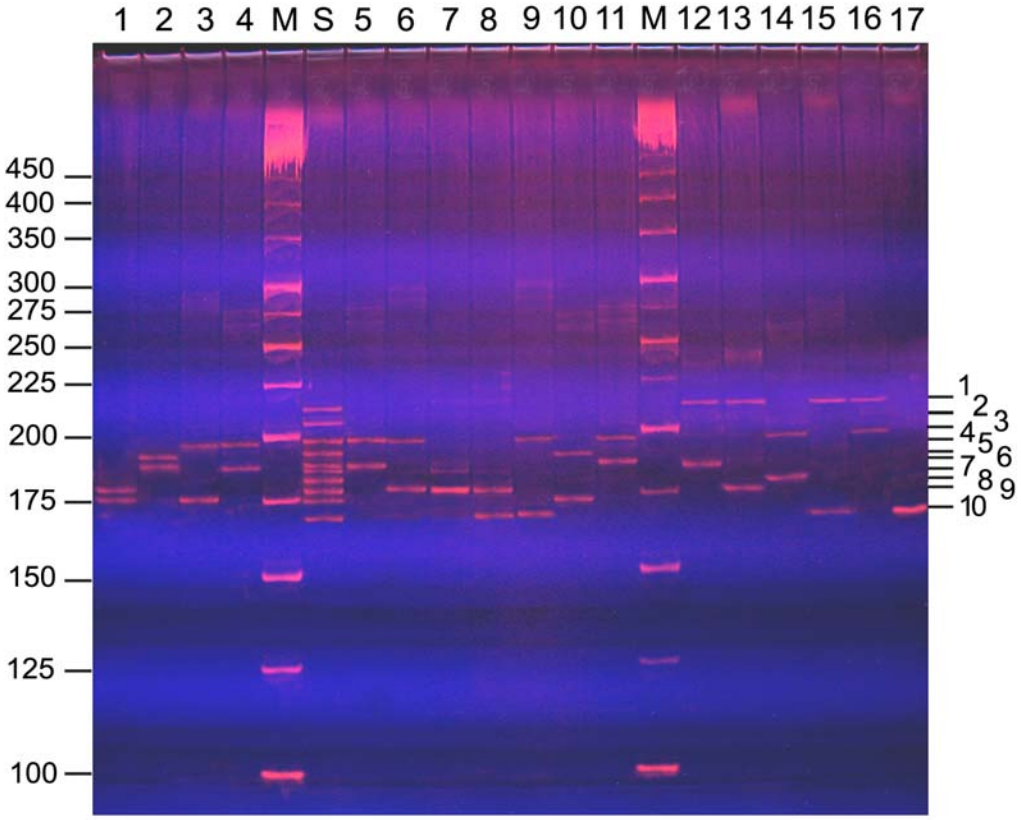


Рис. 6. Аллельное разнообразие по локусу *Omy1001*. В составе стандарта (S) представлены все аллели, обнаруженные у семи исследованных пород радужной форели. Обозначения аллелей даны справа: 1 – 113 п.н., 2 – 205 п.н., 3 – 197 п.н., 4 – 193 п.н., 5 – 189 п.н., 6 – 187 п.н., 7 – 181 п.н., 8 – 177 п.н., 9 – 175 п.н., 10 – 169 п.н. M – смесь маркеров длины с шагом 25 п.н. и 50 п.н. Длины фрагментов ДНК в составе маркеров указаны слева (п.н.). Лунки 1–11 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК стальноголового лосося, 12–17 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Адлер”.

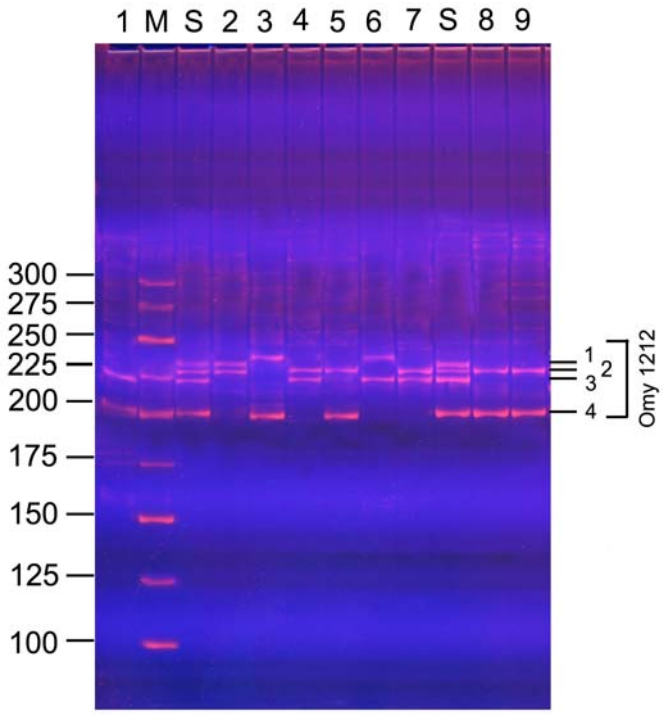


Рис. 7. Аллельное разнообразие по локусу *Omy1212*. В составе стандарта (S) представлены аллели 1–4 (обозначения аллелей указаны справа): 1 – 232 п.н., 2 – 228 п.н., 3 – 224 п.н., 4 – 202 п.н. В пробах, нанесенных в лунки 3 и 6, помимо аллелей, представленных в стандарте, имеется аллель 5 с подвижностью 236 п.н. M – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов ДНК, представленных в составе маркера, приведены слева (п.н.). Лунки 1–9 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК радужной форели породы “Адлерская янтарная”.

Таблица 4. Число аллелей микросателлитных локусов и наблюдаемая гетерозиготность (в скобках) в изученных выборках радужной форели

Порода	Локус *One111*	Локус *Ssa197*	Локус *Ssa408*	Средняя
Рофор	6 (0.542)	2 (0.417)	9 (0.792)	17 (0.583)
Росталь	4 (0.750)	2 (0.292)	4 (0.625)	10 (0.556)
Стальноголовый лосось	4 (0.733)	3 (0.467)	6 (0.933)	12 (0.711)
Адлер	3 (0.318)	2 (0.500)	4 (0.727)	9 (0.515)
Адлерская янтарная	4 (0.667)	2 (0.250)	3 (0.750)	9 (0.556)
Форель Дональдсона	5 (0.522)	2 (0.348)	6 (0.696)	13 (0.522)
Камлоопс	2 (0.304)	2 (0.435)	7 (0.913)	11 (0.551)

Таблица 5. Генетические дистанции и значимость различий в частотах аллелей между изученными выборками радужной форели (* – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.001$)

Сравниваемые породы	*One111*	*Ssa197*	*Ssa408*	По трем локусам
Рофор – Росталь	0.187 ***	0.160 *	0.155 ***	0.164
Рофор – Стальноголовый лосось	0.355 ***	0.284 **	0.071 *	0.272
Рофор – Адлер	0.024	0.022	0.437 ***	0.122
Рофор – Адлерская янтарная	0.452 ***	0.449 ***	1.491 ***	0.621
Рофор – Форель Дональдсона	0.029 *	0.014	0.648 ***	0.145
Рофор – Камлоопс	0.443 ***	0.010	0.782 ***	0.257
Росталь – Стальноголовый лосось	0.201 ***	0.003	0.385 ***	0.156
Росталь – Адлер	0.391 ***	0.021	0.372 ***	0.219
Росталь – Адлерская янтарная	0.370 ***	0.035 *	2.268 ***	0.439
Росталь – Форель Дональдсона	0.178 ***	0.092	0.507 ***	0.218
Росталь – Камлоопс	0.847 ***	0.258 ***	0.660 ***	0.524
Стальноголовый лосось – Адлер	0.792 ***	0.086 *	0.330 ***	0.363
Стальноголовый лосось – Адлерская янтарная	0.102 *	0.004	2.835 ***	0.272
Стальноголовый лосось – форель Дональдсона	0.465 ***	0.190 **	0.640 ***	0.387
Стальноголовый лосось – Камлоопс	0.454 ***	0.418 ***	1.044 ***	0.533
Адлер – Адлерская янтарная	0.697 ***	0.176 ***	1.000 ***	0.738
Адлер – форель Дональдсона	0.053 ***	0.007	0.066 ***	0.040
Адлер – Камлоопс	0.703 ***	0.070 *	1.332 ***	0.522
Адлерская янтарная – форель Дональдсона	0.403 ***	0.321 ***	3.011 ***	0.709
Адлерская янтарная – Камлоопс	0.961 ***	0.631 ***	2.155 ***	0.973
Форель Дональдсона – Камлоопс	1.051 ***	0.011	1.570 ***	0.592

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие пород радужной форели. Экспериментальные данные, представленные в Таблице 2, наглядно демонстрируют весьма значительное снижение генетического разнообразия у радужной форели, подвергавшейся селекции и образовавшей самостоятельные породы.

Так, если в шести перечисленных выше микросателлитных локусах у радужной форели из природных популяций зарегистрировано в общей сложности 126 аллелей (литературные данные, ссылки см. в Табл. 2), то у радужной форели семи пород, представленных в маточных стадах ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”» и ФГУП “ФСГЦР” в тех же локусах обнаружено, в общей сложности, лишь около 40 аллелей. Таким образом, у форели, подвергавшейся селекции, генетическое разнообразие по микросателлитам оказывается сниженным не менее чем в 3 раза.

Максимальное число аллелей, которое было нами зарегистрировано у радужной форели — 11 аллелей для локуса *Ssa408*, локализованного в половой хромосоме, — более чем вдвое уступает числу аллелей, найденных в природных популяциях вида (28 аллелей). Что же касается каждой конкретной породы, то число аллелей этого локуса для любой из них не превышает девяти (табл. 2).

На генетическую адаптацию к искусственным условиям выращивания и влияние селекционного процесса на группы рыб в сторону сужения генетического разнообразия указывает и тот факт, что породы, имеющие разное происхождение, сильно различающиеся как морфологически, так и по времени нереста, имеют, в основном, общий набор аллелей для каждого из исследованных локусов.

Интересно, что форель породы “Росталь”, происходящая от одной пары производителей (Терентьева, 1995), сохранила максимально возможный в этом случае уровень генетического разнообразия: в локусах *One111* и *Ssa408* эта группа рыб имеет по четыре аллеля. Очевидно, обе рыбы, ставшие родоначальниками данной породы, были гетерозиготами по двум указанным локусам. Это, вероятно, указывает на то, что при отборе основателей новой породы наи-

более гетерозиготные рыбы проявили наилучшие хозяйственно-ценные признаки. Такая взаимосвязь отмечена в литературе для радужной форели и других видов лососевых (обзор: Артамонова, Махров, 2015).

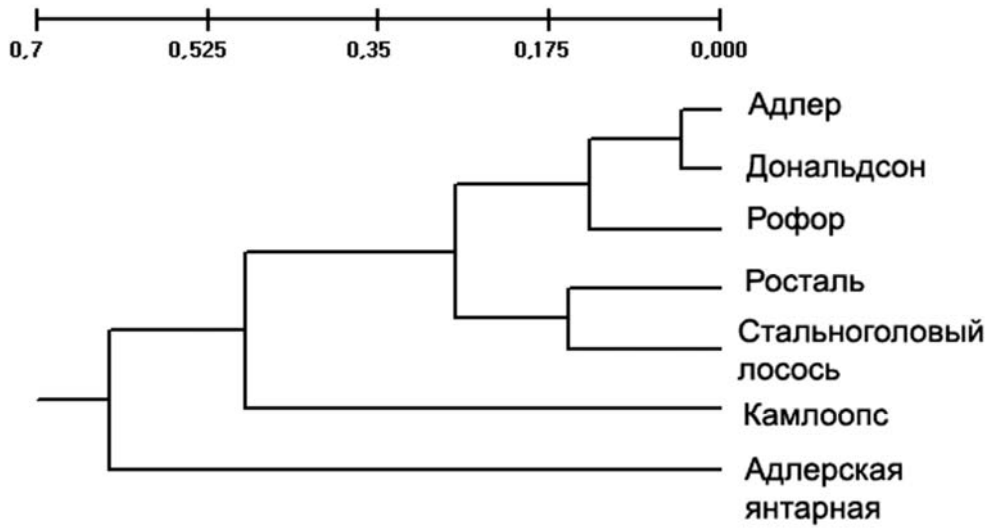


Рис. 8. Дендрограмма, основанная на генетических дистанциях (Nei, 1978), построенная по совокупности данных для трех изученных микросателлитных локусов – *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*.

Возникновение породы “Росталь” может быть моделью происхождения новой популяции радужной форели от пары производителей; необходимо дальнейшее изучение ее генетических особенностей. Оказалось, что генетическое разнообразие у породы “Росталь” хотя и снизилось по сравнению со стальноголовым лососем, но не столь значительно, как этого можно было ожидать. В некоторых локусах зарегистрировано более четырех аллелей, причем часть из них не выявлена у стальноголового лосося. Видимо, тесный инбридинг у радужной форели породы “Росталь” привел к росту рекомбинации микросателлитных локусов (Artamonova et al., 2010). Отметим, однако, что тестированный нами стальноголовый лосось происходит от рыб, завезенных в СССР из США, а порода “Росталь” происходит от стальноголового лосося, завезенного в СССР из Финляндии (Породы радужной форели …, 2006).

Различия в частотах аллелей двух из трех тестированных локусов между стальноголовым лососем и происходящей от него породой “Росталь” значимы (табл. 5). Это говорит о том, что различия в частотах аллелей микросателлитных локусов могут возникнуть уже за несколько поколений, поэтому такие различия не могут быть критерием вида. Между тем, они использовались, например, для обоснования видового статуса некоторых форм миног (ссылки см.: Махров, Попов, 2015).

Дифференциация пород радужной форели, выявляемая методами микросателлитного анализа. Несмотря на то, что большинство аллелей микросателлитных локусов являются общими для всех пород радужной форели, в генофонде практически каждой из них имеются аллели, характерные только для этой породы или для группы пород. Уникальный аллель локуса *One111* есть у форели породы “Рофор”, уникальные аллели по локусу *Ssa408* встречены у пород “Рофор”, “Росталь” и форели Дональдсона. Кроме того, изученные выборки значимо отличаются по частотам аллелей всех изученных локусов.

Распределение изученных выборок на дендрограмме генетических дистанций (рис. 8) отражает историю формирования пород, которые представляют изученные нами выборки. Наиболее сильно дивергировали форель “Адлерская янтарная”, полученная путем селекции радужной форели неустановленного происхождения, и форель Камлоопс, происходящая от изолированной популяции. Далее отделяется ветвь, объединяющая стальноголового лосося и происходящую от него породу “Росталь”. Оставшаяся ветвь объединяет три породы, исходный материал для которых был получен в результате гибридизации рыб, происходящих из нескольких разных популяций – форель Дональдсона, породы “Адлер” и “Рофор”.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Изучение происхождения отдельных групп рыб. Как отмечено выше, генетическое сходство между породами радужной форели в значительной степени отражает историю происхождения пород. Таким образом, молекулярные маркеры дают возможность изучить про-

исхождение форм радужной форели золотистой окраски, разводимых в нескольких рыбоводных хозяйствах Российской Федерации. Можно сравнить генетические характеристики этих форм и с имеющимися в литературе (Cordes et al., 2006) характеристиками калифорнийской золотой форели (California golden trout).

Значительный интерес представляет изучение групп особей, находящихся в процессе селекции — "зарождающихся" пород радужной форели. Это ранненерестующий Камлоопс ("Августин") и поздненерестующий стальноголовый лосось (Моисеева, 2015), а также формы золотистой окраски, разводимые в ЗАО СПЗ "Форелевый" (Арсенюк, 2002) и ФГУП "ФСГЦР" (Никандров и др., 2014).

Предварительные оценки показывают, что после создания электронной базы данных, основанной на результатах микросателлитного анализа локусов *One111*, *Ssa197*, *Omy1001*, *Omy1300* и *Ssa407* для 50 рыб каждой породы радужной форели, принадлежность любой конкретной рыбы к определенной породе может быть установлена с точностью не менее 90%. В случае недостаточной точности в определении принадлежности рыб к конкретной породе, в базе данных могут быть дополнительно представлены сведения для микросателлитного локуса *Omy1212*.

Связь разнообразия микросателлитных локусов с хозяйственно-ценными признаками. В локусе *Ssa197* нами было зарегистрировано только два аллеля: 1 — аллель с меньшей подвижностью в полиакриламидном геле (112 п.н., "медленный") и аллель 2 — с большей подвижностью (108 п.н., "быстрый"). Оба аллеля были обнаружены в маточных стадах всех пород радужной форели. Однако частоты этих двух аллелей значительно различались в разных маточных стадах, причем у рыб раннего нереста преобладал «медленный», а у рыб позднего нереста — «быстрый» аллель.

Ранее было отмечено, что локус *Ssa197* может находиться под влиянием отбора в природных популяциях атлантического лосося (Spidle et al., 2003), хотя указаний на связь отбора по этому локусу с конкретными факторами среды в литературе не имеется. Обнаруженная нами корреляция частот аллелей этого локуса со временем нереста позволяет надеяться, что учет этого фактора даст возможность эффективнее вести селекцию, нацеленную на более раннее или более позднее созревание рыб. Косвенным свидетельством в пользу отбора по этому локусу в процессе селекции может служить тот факт, что в работе (Heggenes et al., 2006) у искусственно разводимой радужной форели также были зарегистрированы только два аллеля локуса *Ssa 197*, причем подвижность одного из них (112 п.н.) совпадает с подвижностью аллеля, обнаруженного нами у отечественных пород, и доминирующего у групп рыб с поздним нерестом.

Сцепление микросателлитных локусов с локусами, влияющими на хозяйственно-ценные признаки, интенсивно изучается западными исследователями (Jackson et al., 1998; Sakamoto et al., 1999; Perry et al., 2001; Rodriguez et al., 2004; Sundin et al., 2005; Allen et al., 2014).

Мониторинг генетического разнообразия. Как показывают результаты настоящей работы, породы радужной форели в значительной степени генетически обеднены по сравнению с природными популяциями этого вида. Это практически неизбежно, поскольку направленная селекция часто ведет к потере генетического разнообразия. Кроме того, родоначальники ряда пород попадали в Россию достаточно долгими и сложными путями, «теряя» по пути аллели в результате случайных процессов.

В связи с этим целесообразно проведение мониторинга генетического разнообразия пород радужной форели. Полученные в настоящей работе данные могут служить «отправной точкой» такого мониторинга.

Выявление полиплоидных особей. В настоящее время все большее значение в аквакультуре приобретает получение полиплоидных, и особенно триплоидных форм рыб. Гонады триплоидных самок радужной форели не развиваются, гонады триплоидных самцов развиваются плохо, поэтому в период полового созревания триплоидная радужная форель опережает по темпу роста диплоидную. Триплоидную радужную форель выращивают в США, Великобритании, Франции, Японии, Корее, Иране, Турции, Польше и Чили (обзор: Piferrer et al., 2009). В России опытное выращивание триплоидной радужной форели осуществлялось на базе ФГУП ПФЗ "Адлер".

Контроль триплоидии связан с необходимостью определения плоидности большого количества рыб, что может успешно практиковаться с использованием анализа микросателлитов (Lampert et al., 2006). Анализ микросателлитов успешно использован нами для выявления триплоидов радужной форели (Артамонова, Махров, 2015).

ВЫВОДЫ

1. Все изученные породы радужной форели имеют свою генетическую специфику и могут быть адекватно охарактеризованы методами микросателлитного анализа.

2. Породы радужной форели отличаются пониженным уровнем генетического разнообразия по сравнению с природными популяциями этого вида. Целесообразно проведение мониторинга генетического разнообразия искусственно разводимой радужной форели.

3. С целью выявления внутривидовых триплоидов целесообразно использовать микросателлитный анализ. Такой анализ следует проводить по двум микросателлитным локусам одновременно, выбирая такие, которые либо наиболее полиморфны у производителей, либо содержат в значительном количестве аллели, уникальные для этой группы рыб.

4. Различия в частотах аллелей микросателлитных локусов могут возникнуть уже за несколько поколений, поэтому такие различия не могут быть критерием вида.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-02550, а также Программой “Биоразнообразие природных систем” (подпрограмма "Генофонды живой природы и их сохранение").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с. (Altukhov Yu. P., Salmenkova E. A., Omelchenko V.T. Salmonid fishes. Population biology, genetics and management. Oxford: Blackwell Science. 2000. 354 p.)

Арсенюк Н.Г. Способы повышения эффективности использования рыбоводно-технологической базы форелевого хозяйства. Автореф. дисс. … канд. сельскохоз. наук. Краснодар: Кубанский гос. аграрный университет. 2002. 24 с. Arsenuk N.G. Sposoby povysheniia effectivnosti ispolzovaniia rybovodno-tekhnologicheskoi basy forelevogo khoziaistva. Avtoreferat dissertatsii … kandidata selskokhoziaistvennykh nauk. Krasnodar: Krasnodarskii gosudarstvennyi selskokhoziaistvennyi universitet. 2002. 24 s. [Arsenuk N.G. Ways to improve the utilization of fish breeding and processing base of trout farm. Abstract of Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Agricultural Sciences. Krasnodar: Krasnodar State Agricultural University. 2002. 24 p.] In Russian

Артамонова В.С., Махров А.А. Генетические методы в лососеводстве и форелеводстве: от традиционной селекции до нанобиотехнологий. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2015. 128 с. Artamonova V.S., Makhrov A.A. Geneticheskie metody v lososevodstve i forelevodstve: ot traditsionnoi selektsii do nanobiotekhnologii. Moskva: Tovarishchestvo nauchnykh izdanii KMK. 2015. 128 s. [Artamonova V.S., Makhrov A.A. Genetic Methods in Salmon and Trout Breeding: From Traditional Selection to Nanobiotechnologies. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 2015. 128 p.] In Russian

Барминцев В.А., Зеленина Д.А., Волков А.А., Савченко И.М., Богерук А.К. Молекулярно-генетическая идентификация пород радужной форели // Материалы межд. симпозиума "Холодноводная аквакультура: старт в XXI век". Россия, СПб, 8-13 сентября 2003 г. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. С. 196–197. Barmintsev V.A., Zelenina D.A., Volkov A.A., Savchenko I.M., Bogeruk A.K. Molekularno-geneticheskaia identifikatsiia porod raduzhnoi foreli // Materialy mezhdunarodnogo simposiyma “Kholodnovodnaia akvakultura: start v XXI vek”. Rossiia, Sankt-Peterburg, 8-13 sentiabria 2003 goda. Moskva: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2003. S. 196–197. [Barmintsev V.A., Zelenina D.A., Volkov A.A., Savchenko I.M., Boguerouk A.K. Molecular genetic identification of rainbow trout strains // Proceeding of International symposium "Cold water aquaculture: start in the XXI century", Russia, Saint-Petersburg, September 8-13, 2003. Moscow: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2003. P. 196–197.] In Russian

Белаш Д.Э., Тыщенко В.И., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф., Голод В.М., Терентьева Е.Г. Изучение генетического разнообразия пород форели методом ДНК фингерпринтинга // Матер. конф., посвящ. 100-летию научной селекции в России. М. МСХА. 2003. с. 191–192. Belash D.E., Tyschenko V.I., Dement’eva N.V., Terletski V.P., Yakovlev A.F., Golod V.M., Terent’eva E.G. Izuchenie geneticheskogo raznoobraziia porod foreli metodom DNK fingerprintinga // Materialy konferentsii posviashchennoi 100-letiiu nauchnoi selektsii v Rossii. Moskva: MSKHA. 2003. S. 191–192. [Belash D.E., Tyschenko V.I., Dementieva N.V., Terletski V.P., Yakovlev A.F., Golod V.M., Terentieva E.G. The study of the genetic diversity of trout strains by DNA fingerprinting // 100th anniversary of the scientific selection in Russia. Proceedings of the conference. Moscow: Moscow Academy of Agricultural Sciences. 2003. P. 191–192.] In Russian

Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука. 2006. 462 с. Genofondy sel’skokhoziastvennykh zhivotnykh: geneticheskie resursy zhivotnovodstva Rossii. Moskva: Nauka. 462 s. [Gene pools of farm animals: Genetic resources of animal husbandry in Russia. Moscow: Science. 2006. 462 p.] In Russian

Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т. Введение в геномную селекцию животных. М.: Изд-во “Приятная компания”. 2012. 258 с. Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Glazko T.T. Vvedenie v genomnuiu selektsiiu zhivotnykh. Moskva: “Priiatnaia kompaniia”. 2012. 258 s. [Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Glazko T.T. Introduction in genomic selection of animals. Moscow: “Nice Company” Press. 2012. 258 p.] In Russian

Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. Киев: "Урожай". 1993. 526 с. Glazko V.I., Sozinov I.A. Genetika izofermentov zhivotnyh i rastenii. Kiev: Urozhai, 1993. 526 s. [Glazko V.I., Sozinov I.A. Genetics of isoenzymes of animals and plants. Kiev: Harvest. 1993. 528 p.] In Russian

Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 343 с. Glubokovskii M.K. Evoliutsionnaia biologiia lososevykh ryb. Moscow: Nauka, 1995. 343 s. [Glubokovsky M.K. Evolutionary biology of salmonid fishes. Moskow: “Nauka”. 343 p.] In Russian

Дарвин Ч. 1941. Изменение животных и растений в домашнем состоянии. М.-Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз. 619 с. (Darwin C. The variation of animals and plants under domestication. V. 1. London: John Murray. 1868. 411 p.)

Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Белаш Д.Э., Голод В.М., Терентьева Е.Г. Генетическое разнообразие и дивергенция некоторых видов и пород лососевых рыб // Генетика, селекция и племенное дело в аквакультуре России. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. С. 188–195. Dementieva N.V., Terletski V.P., Tyschenko V.I., Belash D.E., Golod V.M., Terentieva E.G. Geneticheskoe raznoobrazie i divergeytsiia nekotorykh vidov i porod lososevykh ryb // Genetika, selectsiia I plemennoe delo v akvakul’ture Rossii. Moskva: “Rosinformagrotekh”. 2005. S. 188–195. [Dementieva N.V., Terletski V.P., Tyschenko V.I., Belash D.E., Golod V.M., Terentieva E.G. Genetic diversity and divergence of some species and strains of salmonids // Genetics, selection and breeding in aquaculture of Russia. Moscow: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2005. P. 188–195.] In Russian

Захаров В.С. Товарное рыбоводство в Российской Федерации и тенденции его развития // Состояние и перспективы развития пресноводной аквакультуры. М. ВНИИР. 2013. С. 39–42. Zakharov V.S. Tovarnoe rybovodstvo v Rossiiskoi Federatsii i tendentsii ego razvitiia // Sostoianie i perspectivy razvitiia presnovodnoi akvakul’tury. Moskva: VNIIR. 2013. S. 39–42. [Zakharov V.S. Commercial fish farming in the Russian Federation and development trends // Condition and perspective of freshwater aquaculture development. Moscow: All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Farming. 2013. P. 39–42.] In Russian

Зелинский Ю.П., Махров А.А. Хромосомная изменчивость, реорганизации генома в филогенезе и систематические отношения благородных лососей *Salmo* и *Parasalmo* (*Salmonidae*) // Вопр. ихтиол. 2001. Т. 41. № 2. С. 184–191. (Zelinsky Yu.P., Makhrov A.A. Chromosomal variability, genome reorganization in phylogeny, and the systematics of *Salmo* and *Parasalmo* species (Salmonidae) // J. Ichthyol. 2001. 41. 209–216.)

Махров А.А., Попов И.Ю. Жизненные формы миног (Petromyzontidae) как проявление внутривидового разнообразия онтогенеза // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 4. С. 240–251. (Makhrov A.A., Popov I.Yu. Life forms of lampreys (Petromyzontidae) as a manifestation of intraspecific diversity of ontogenesis // Russian Journal of Developmental Biology. 2015. 46. 196–207. DOI: 10.1134/S1062360415040074)

Моисеева Е.В. Биологические основы повышения эффективности разведения радужной форели *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* в условиях племенных заводов. Дисс. … канд. биол. наук. Краснодар: Кубанский гос. университет. 2015. 201 с. Moiseeva E.V. Biologicheskie osnovy povysheniia effectivnosti razvedeniia raduzhnoi foreli *Parasalmo (=Oncorhynchus) mykiss* v usloviiakh plemennykh zavodov. Dissertatsiia … kandidata biologicheskikh nauk. Krasnodar: Krasnodarskii gosudarstvennyi universitet. 2015. 201 s. [Moiseeva E.V. The biological bases of increase of efficiency of breeding rainbow trout *Parasalmo (= Oncorhynchus) mykiss* in a breeding hatcheries. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Biology. Krasnodar: Krasnodar State University. 2015. 201 p.] In Russian

Никандров В.Я., Шиндавина Н.И., Бабий В.А., Янковская В.А., Сртлян В.Е. Характеристика породы радужной форели Адлер и перспективы ее использования // Рыбное хоз-во. Сер. "Актуальные научно-технические проблемы отрасли". 2002. вып. 2. С. 33–58. Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Babii V.A., Jankovskaia V.A., Srtlian V.E. Kharakteristika porody raduzhnoi foreli Adler i perspektivy ee ispolzovaniia // Rybnoe khozjaistvo. Seria “Aktualnye nauchno-tekhnicheskie problemy otrasli”. 2002. Vyp. 2. S. 33–58. [Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Babii V.A., Yankovskaya V.A., Srtlian V.E. Characteristics of the rainbow trout strain Adler and prospects of its use // Fisheries. Current scientific and technical problems of the industry. 2002. P. 33–58.] In Russian

Никандров В.Я., Шиндавина Н.И., Голод В.М., Терентьева Е.Г. 2014. Вариант желтой окраски у форели Рофор // Рыбное хоз-во. № 2. С. 95–98. Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Golod V.M., Terenteva E.G. Variant zolotoi okraski u foreli Rofor // Rybnoe khoziaistvo. No. 2. S. 95–98. [Nikandrov V.Y., Shindavina N.I., Golod V.M., Terenteva E.G. Yellow color of Rofor trout coloration // Fisheries (Moscow). 2014. 95–98.] In Russian

Орлова М.И. Биологическая инвазия - горнило для эволюции? // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 3. С. 33–46. Orlova M.I. Biologicheskaia invasiia – gornilo dlia evolutsii? // Ekologicheskaia genetika. T. 9. No. 3. S. 33–46. [Orlova M.I. Is biological invasion crucible for evolution? // Ecological Genetics. 9. 33–46] In Russian

Паавер Т.К. Электрофоретическая изменчивость белков и генетические особенности выращиваемых в СССР породных групп и стад радужной форели *Salmo gairdneri* // Вопросы ихтиологии. 1988. т. 28. № 4. С. 595–603. (Paaver T.K. Electrophoretic variation of proteins and genetic characteristics of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, strain groups and stocks reared in the USSR // J. Ichthyol. 1988. 28. 24–31.)

Павлов Д.С., Савваитова К.А., Кузищин К.В., Груздева М.А., Павлов С.Д., Медников Б.М., Максимов С.В. Тихоокеанские благородные лососи и форели Азии. М.: Научный мир, 2001. 200 с. Pavlov D.S., Savvaitova K.A., Kuzishchin K.V., Gruzdeva M.A., Pavlov S.D., Mednikov B.M., Maksimov S.V. Tikhookeanskie blagorodnye lososi i foreli Asii. Moskva: Nauchnyi Mir, 200 s. [Pavlov D.S., Savvaitova K.A., Kuzishchin K.V., Gruzdeva M.A., Pavlov S.D., Mednikov B.M., Maksimov S.V. 2001. The Pacific noble salmons and trouts of Asia. Moscow: Scientific World. 200 p.] In Russian

Павлов С.Д., Семенова А.В., Рубцова Г.А., Афанасьев К.И. Анализ изменчивости микросателлитных локусов у камчатской микижи (*Parasalmo* (*Oncorhynchus) mykiss*) // Генетика. 2011. Т. 47. № 10. С. 1346–1356. (Pavlov S.D., Semenova A.V., Rubtsova G.A., Afanasiev K.I. 2011. Analysis of microsatellite variation in the rainbow trout

Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss from Kamchatka // Russ. J. Genetics. 47. 1198–1208. DOI: 10.1134/S1022795411100139)

Породы радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* W.). М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2006. 316 с. Porody raduzhnoi foreli (*Oncorhynchus mykiss* W.). Moskva: FGNU "Rosinformagrotekh". 2006. 316 s. [Strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). Moscow: FGNU "Rosinformagrotekh". 2006. 316 p.] In Russian

Сексте Э.А., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Шиндавина Н.И., Яковлев А.Ф. 2008. Молекулярно-генетический анализ гетерогенности пород радужной форели // Докл. РАСХН. № 1. с. 43–46. Sekste E.A., Dementeva N.V., Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Shindavina N.I., Yakovlev A.F. Molekuliarno-geneticheskii analuz geterogennosti porod raduzhnoi foreli // Doklady RASKHN. No. 1. S. 43–46. [Sekste E.A., Dementeva N.V., Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Shindavina N.I., Yakovlev A.F. The molecular genetic analysis (RAPD) of heterogeneity of rainbow trout breeds // The Russian Academy of Agricultural Sciences Reports. 2008. p. 43–46.] In Russian

Семенова А.В., Рубцова Г.А., Афанасьев К.И., Павлов С.Д. Анализ микросателлитной ДНК у камчатской микижи (*Parasalmo* (*Oncorhynchus) mykiss*). Подбор локусов и оптимизация методики // Генетика. 2010. Т. 46. № 7. С. 1004-1008. (Semenova A.V., Rubtsov G.A., Afanas'ev K.I., Pavlov S.D. Analysis of microsatellite DNA of rainbow trout (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) of Kamchatka: Selection of loci and optimization of the method // Russ. J. Genetics. 2010. 46. 891-894. DOI: 10.1134/S1022795410070161)

Терентьева Е.Г. Создание породы форели Росталь (методика и предварительные результаты) // Проблемы товарного выращивания лососевых рыб России. Мурманск: Изд-во ПИНРО. 1995. С. 36–42. Terent'eva E.G. Sozdanie porody foreli Rostal' (metodika i predvaritelnye rezultaty) // Problemy tovarnogo vyrashchivaniia lososevykh ryb Rossii. Murmansk: Izdatelstvo PINRO. 1995. S. 36–42. [Terent'eva E.G. Origin of trout strain "Rostal'" (technique and preliminary results) // Problems of commercial breeding of salmonids in Russia. Murmansk: Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (PINRO) Press. 1995. P. 36–42.] In Russian

Терлецкий В.П., Дементьева Н.В., Тыщенко В.И., Голод В.М., Терентьева Е.Г., Яковлев А.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика некоторых видов рыб семейства лососевых // Цитология. 2004. Т. 46. № 10. С. 868–869. (Terletski V.P., Dementieva N.V., Tyschenko V.I., Golod V.M., Terentieva E.G., Yakovlev A.F. Molecular and genetic characterization of some salmonid fish species // Tsitologiya. 2004. 46. 869–870.)

Титарев Е.Ф. Новые объекты в форелеводстве страны и перспектива их использования // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. 1988. вып. 54. С. 55–61. Titarev E.F. Novye ob''ekty v forelevodstve strany i perspectiva ikh ispolzovaniia // Sbornik nauchnykh trudov VNIIPRKH. 1988. T. 54. S. 55–61. [Titarev E.F. New facilities in trout farming and the prospect of their use // Proceedings of Russian Research Institute of Freshwater Fish Farming. 54. P. 55–61.] In Russian

Фролов С.В. Изменчивость и эволюция кариотипов лососевых рыб. Владивосток: Дальнаука, 2000. 229 с. Frolov S.V. Izmenchivost' i evoliutsiia kariotipov lososevykh ryb. Vladivostok: Dalnauka. 2000. 229 s. [Frolov S.V. Karyotype variability and evolution in Salmonidae. Vladivostok: Dalnauka. 2000. 229 p.] In Russian, summary in English

Шатуновский М.И., Агрба М.А., Котова Н.И. Перевозка и акклиматизация стальноголового лосося в СССР // Труды ВНИРО. 1970. Т. 76. С. 123–129. Shatunovskii M.I., Agrba M.A., Kotova N.I. Perevozka i akklimatizatsiia stalnogolovogo lososja v SSSR // Trudy VNIRO. T. 76. S. 123–129. [Shatunovsky M.I., Agrba M.A., Kotova N.I. Transportation and acclimatization of steelhead in the USSR // Proceedings of All-Union research institute of fisheries and oceanography. 1970. 76. 123–129.] In Russian

Шиндавина Н.И., Никандров В.Я., Янковская В.А. Порода радужной форели золотистой окраски форель Адлерская янтарная // Сб. научн. тр. ГосНИОРХ. 2005. Вып. 33. С. 161–181. Shindavina N.I., Nikandrov V.Ia., Yankovskaia V.A. Poroda raduzhnoi foreli zolotistoi okraski forel' Adlerskaia Iantartaia // Sbornik nauchnykh trudov GosNIORKh. 2005. T. 33. S. 161–181. [Shindavina N.I., Nikandrov V.Y., Yankovskaya V.A. The strain of rainbow trout golden color Adler amber // Proceedings of State Research Institute of Lake and River Fisheries. 2005. 33. 161-181.] In Russian

Abadía-Cardoso A., Anderson E.C., Pearse D.E., Garza J.C. Large-scale parentage analysis reveals reproductive patterns and heritability of spawn timing in a hatchery population of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) // Mol. Ecol. 2013. 22. 4733–4746.

Allen M.S., Ferguson M.M., Danzmann R.G. Molecular Markers for Variation in Spawning Date in a Hatchery Population of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Mar. Biotechnol. 2014. 16. 289–298.

Artamonova V.A., Terentyeva E.G., Rysakova K.S., Golod V.M., Makhrov A.A., Boguerouk A.K., Lyzhov I.I. Maintenance and rapid restoration of genetic diversity in an experimental model of the founder effect in the rainbow trout // The III International Symposium "Invasion of alien species in Holarctic. Borok – 3". Programme and Book of Abstracts. October 5th-9th 2010, Borok - Myshkin, Yaroslavl District, Russia. Editors: Yu. Slynko, Yu. Dgebuadze, A. Krylov, D. Karabanov. Yaroslavl: Print-House Publ. Co. 2010. p. 33.

Avise J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Second Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 684 p.

Behnke R.J. 2002. Trout and salmon of North America. New York etc.: The Free Press. 360 p.

Boguerouk A.K., Volkov A.A., Zelenina D.A., Barmintsev V.A. Discrimination of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) strains by the microsatellite and RAPD-PCR analysis // Aquaculture. 2007. 272. S. 246.

Busack C.A., Halliburton R., Gall G.A.E. Electrophoretic variation and differentiation in four strain of domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Can. J. Genet. Cytol. 1979. 21. 81–94.
Cairney M., Taggart J.B., Hoyheim B. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids // Mol. Ecol. 2000. 9. 2155–2234.
Campbell N.R., Overturf K., Narum S.R. Characterization of 22 novel single nucleotide polymorphism markers in steelhead and rainbow trout // Mol. Ecol. Res. 2009. 9. 318–322.
Colihueque N., Iturra P., Estay F., Díaz N.F. Diploid chromosome number variations and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // Aquaculture. 2001. 198. 63–77.
Cordes J.F., Stephens M.R., Blumberg M.A., May B. Identifying introgressive hybridization in native populations of California golden trout based on molecular markers // Trans. Amer. Fish. Soc. 2006. 135. 110–128.
Crawford S.S., Muir A.M. Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007 // Rev. Fish. Biol. Fisheries. 2008. 18. 313–344.
Danzmann R.G., Ferguson M.M., Arndt S.K.A. Mitochondrial DNA variability in Ontario and New York rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Can. J. Zool. 1993. 71. 1923–1933.
Garant D., Dodson J.J., Bernatchez L. Ecological determinants and temporal stability of the within-river population structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Mol. Ecol. 2000. 9. 615–628.
Garcia-Berthou E., Alcaraz C., Pou-Rovira Q., Zamora L., Coenders G., Feo C. Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2005. 62. 453–463.
Glover K.A. Genetic characterization of farmed rainbow trout in Norway: intra- and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees // BMC Genetics. 2008. 9. 87.
Gross R., Lulla P., Paaver T. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe // Aquaculture. 2007. 272. S139–S146.
Guyomard R. Electrophoretic variation in four French populations of domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Can. J. Genet. Cytol. 1981. 23. 33–47.
Guyomard R., Mauger S., Tabet-Canale K., Martineau S., Genet C., Krieg F., Quillet E. A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms // BMC Genomics. 2006. 7. 302.
Hansen M.M., Kenchington E., Nielsen E.E. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // Fish and Fisheries. 2001. 2. 93–112.
Heggenes J., Beere M., Tamkee P., Taylor E.B. Genetic diversity in steelhead before and after conservation hatchery operation in a coastal, boreal river // Trans. Amer. Fish. Soc. 2006. 135. 251–267.
Hendry A., Stearns S., eds. 2004. Evolution illuminated: Salmon and their relatives. Oxford: Oxford University Press. 520 p.
Jackson T.R., Ferguson M.M., Danzmann R.G., Fishback A.G., Ihssen P.E., O'Connell M., Crease T.J. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families // Heredity. 1998. 80. 143–151.
Keeley E.R., Parkinson E.A., Taylor E.B. Ecotypic differentiation of native rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations from British Columbia // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2005. 62. 1523–1539.
Kincaid H.L. Trout strain registry. Kearneysville: National Fisheries Center-Leetown. 1981. 118 p.
Koljonen M.-L. The enzyme gene variation of ten Finnish rainbow trout strains and the relation between growth rate and mean heterozygosity // Aquaculture. 1986. 57. 253–260.
Lampert K.P., Lamatsch D.K., Schories S., Hopf A., Garcia de Leon F.J., Schartl M. Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity // J. Genetics. 2006. 85. 67–71.
Liu S., Palti Y., Gao G., Rexroad III C.E. Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout // Aquaculture. 2016. 452. 178–182.
Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. Auckland: Invasive species specialist group. 2004. 12 p.
McPhee M.V., Utter F., Stanford J.A., Kuzishchin K.V., Savvaitova K.A., Pavlov D.S., Allendorf F.W. Population structure and partial anadromy in *Oncorhynchus mykiss* from Kamchatka: relevance for conservation strategies around the Pacific Rim // Ecol. Fresh. Fish. 2007. 16. 539–547.
Miller M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). Version 1.3. A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
Nakajima M., Fujio Y. Genetic differentiation in cultured populations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Japan // Tohoku Journal of Agricultural Research. 1988. 38. 35–48.
Needham P.R., Behnke R.J. The origin of hatchery rainbow trout // Progressive Fish Culturist. 1962. 24. 156–158.
Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. 89. 583–590.
Nichols K.M., Young W.P., Danzmann R.G., Robison B.D., Rexroad C., Noakes M., Phillips R.B., Bentzen P., Spies I., Knudsen K., Allendorf F.W., Cunningham B.M., Brunelli J., Zhang H., Ristow S., Drew R., Brown K.H., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Animal Genetics. 2003. 34. 102–115.

Nielsen E.E., Hansen M.M., Loeschcke V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years // Mol. Ecol. 1997. 6. 487–492.
O'Connell M., Wright J.M. Microsatellite DNA in fishes // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 1997. 7. 331–363.
O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1996. 53. 2292–2298.
Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // Mol. Ecol. 2000. 9. 2155–2234.
Palti Y., Gao G., Liu S., Kent M.P., Lien S., Miller M.R., Rexroad C.E. III, Moen T. The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout // Mol. Ecol. Res. 2015. 15. 662–672.
Palva T.K., Palva E.T. Restriction site polymorphism in mitochondrial DNA of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, stocks in Finland // Aquaculture. 1987. 67. 283–289.
Paterson S., Piertney S.B., Knox D., Gilbey J., Verspoor E. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites // Mol. Ecol. Notes. 2004. 4. 160–162.
Perry G.M.L., Danzmann R.G., Ferguson M.M., Gibson J.P. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Heredity. 2001. 86. 333–341.
Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.-C., Flajšhans M., Haffray P., Colombo L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and application to aquaculture for performance improvement and genetic containment // Aquaculture. 2009. 293. 125–156.
Rengmark A.H., Sletten A., Skaala Ø. Lie Ø., Lingaas F. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimates by SNP and microsatellites // Aquaculture. 2006. 253. 229–237.
Rexroad III C.E., Coleman R.L., Gustafson A.L., Hershberger W.K., Killefer J. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries // Marine Biotechnology. 2002. 3. 12–16.
Rodriguez M.F., LaPatra S., Williams S., Famula T., May B. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses // Aquaculture. 2004. 241. 93–115.
Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: x2 and the problem of small samples // Mol. Biol. Evol. 1989. 6. 539–545.
Sajedi R.H., Aminzadeh S., Naderi-Manesh H., Sadeghizadeh M., Abdolhay H., Naderi-Manesh M. Genetic variation within and among rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, hatchery populations from Iran assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments // J. Food Science. 2003. 68. 870–873.
Sakamoto T., Danzmann R.G., Okamoto N., Ferguson M.M., Ihssen P.E. Linkage analysis of quantitative loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. 1999. 173. 33–43.
Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 1626 p.
Silverstein J.T., Rexroad III C.E., King T.L. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // Aquaculture Research. 2004. 35. 40–48.
Smith G.R., Stearley R.F. The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts // Fisheries. 1989. 14. 4–10.
Spidle A.P., Kalinowski S.T., Lubinski B.A., Perkins D.L., Beland K.F., Kocik J.F., King T.L., Population structure of Atlantic salmon in Maine with reference to populations from Atlantic Canada // Trans. Amer. Fish. Soc. 2003. 132. 196–209.
Sprowles A.E., Stephens M.R., Clipperton N.W., May B.P. Fishing for SNPs: A targeted locus approach for single nucleotide polymorphism discovery in rainbow trout // Trans. Amer. Fish. Soc. 2006. 135. 1698–1721.
Stanković D., Crivelli A.J., Snoj A. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts // Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 2015. 23. 39–71.
Stephens M.R. Systematics, genetics and conservation of golden trout. Dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of doctor of philosophy. Davis: University of California. 2007. 149 p.
Stephens M.R., Clipperton N.W., May B. Subspecies-informative SNP assays for evaluating introgression between native golden trout and introduced rainbow trout // Mol. Ecol. Res. 2009. 9. 339–343.
Sundin K., Brown K.H., Drew R.E., Nichols K.M., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. Genetic analysis of a developmental rate QTL in backcrosses of clonal rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Aquaculture. 2005. 247. 75–83.
Thompson D. Genetic identification of trout strains // Aquaculture. 1985. 46. 341–345.
van der Bank F.H., Swart M.K.J., Ferreira J.T. Genetic variation in nine rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in South Africa // Comparative Biochemical Physiology. 1992. 103B. 2. 495–499.
Vasemagi A., Gross R., Paaver T., Koljonen M.-L., Säisä M., Nilsson J. Analysis of gene-associated tandem repeat markers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations: implications for restoration and conservation in the Baltic Sea // Conserv. Genet. 2005a. 6. 385–397.
Vasemagi A., Nilsson J., Primmer C.R. Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Mol. Biol. Evol. 2005б. 22. 1067–1076.
Wangila B.C.C. Electrophoretic characterization of three hatchery-reared strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // Aquaculture and Fisheries Management. 1994. 25. 565–570.

Ward R.D., Jørstad K.E., Maguire G.B. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia // Aquaculture. 2003. 219. 169–179.
Winkler F.M., Diaz N.P., Estay F. Allozyme variation in three commercial strains of rainbow trout in Chile // Aquaculture. 1995. 137. 45.
Zaykin D.V., Pudovkin A.I. Two programs to estimate Chi-square values using pseudo-probability test // J. Heredity. 1993. 84. 152.
Zhao Y.-Y., Zhu X.-C., Sun X.-W. Genetic diversity of the cultured populations of six rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by microsatellite // Hereditas (Beijing). 2006. 28. 956–962 (English abstract).
Zhao Y., Zhu X., Sun X. Microsatellite diversity in cultured populations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in China // J. Fish Biol. 2008. 73. 1249–1255.

GENETIC DIFFERENTIATION OF RAINBOW TROUT (*PARASALMO MYKISS*) STRAINS BRED IN THE RUSSIAN FEDERATION

V. S. Artamonova[1], V. A. Yankovskaya[2], V. M. Golod[3], A. A. Makhrov[4]
[1] A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution;
33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia; e-mail: valar99@mail.ru
[2] OOO "Merke", Sovetskaia str., 46, 143980, Zheleznodorozhnyi town, Moscow region;
e-mail: v.yankovskaya@gmail.com
[3] Federal Centre for Fish Genetics and Selection,
188514, Strelninskoe s., 4, Ropsha, Leningrad region; e-mail: ropshatrout@yandex.ru
[4] A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution;
33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia; e-mail: makhrov12@mail.ru

The genetic diversity of all rainbow trout (*Parasalmo* (*Oncorhynchus) mykiss*) strains included in the State Registry of Breeding Achievements of the Russian Federation, namely, Donaldson trout, Kamloops trout, steelhead salmon, "Rofor", "Rostal", "Adler", and "Adler Amber", has been studied for six microsatellite loci (*Ssa197, Ssa408, Omy1001, Omy1300, Omy1212,* and *One111*). The allele frequency heterogeneity for all these loci among the strains studied is highly significant ($p<0.001$). Although most microsatellite alleles are common for all the rainbow trout strains, the gene pool of practically each of them contains alleles that are specific for this strain or a group of strains. The results of the study can be used for solving practical tasks, such as identifying the strain of a specimen, monitoring genetic diversity, and detecting triploids. In addition, genetic differentiation of rainbow trout breeds reflects the characteristics of the initial stages of the evolutionary process involved in the formation of a new population; therefore, these data may be useful for constructing evolutionary models.

Keywords: microsatellites, alien species, microevolution, domestication, rainbow trout, steelhead salmon, strains.