УДК 575.22:597.442

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ БЕЛОГО И ПЕСТРОГО ТОЛСТОЛОБИКОВ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

О. В. ЗАЛОИЛО, Н. А. БОРИСЕНКО
Институт рыбного хозяйства НААН Украины,
г. Киев, Украина, 03164

И. А. ЗАЛОИЛО
НУБиП Украины,
г. Киев, Украина, 03041

(Поступила в редакцию 30.01.2015)

Введение. Белый (Hypophtalmichthys molitrix) и пестрый (Aristichthys nobilis) толстолобики являются одними из важнейших объектов аквакультуры Украины. Вместе с тем рациональное использование этих видов невозможно без проведения непрерывной селекционной работы, которая в свою очередь нуждается в исчерпывающей информации о генетической структуре и уровне изменчивости популяций. Селекция, базирующаяся только на морфометрических данных фенотипов, не может препятствовать постепенному повышению уровня инбридинга. В результате нежелательных гибридизаций внутри промышленных стад наблюдается существенное снижение продуктивности производителей и качественных показателей потомства.

Анализ источников. Одним из наиболее перспективных путей повышения промышленной эффективности стад за счет контроля уровня изменчивости популяции и прогнозированных результатов скрещивания линий является использование в рыбоводстве генетико-популяционных методов. В частности, современная генетика и селекция промышленных рыб активно использует в исследованиях микросателлитные маркеры, позволяющие определять наличие полиморфизма в одинаковых локусах на уровне отдельных особей популяции in vivo [1, 2, 3, 4]. Несмотря на то, что в генетической структуре ДНК толстолобика уже определен ряд полиморфных микросателлитных локусов, актуальность использования известных и подбора новых маркеров очевидна [5, 6].

Цель работы – исследовать специфику генетической структуры стад толстолобиков из разных племенных хозяйств Украины с использованием трех микросателлитных маркеров.

Материал и методика исследований. В качестве материала для исследований использовались образцы крови, отобранной из хвостовой вены особей белого и пестрого толстолобиков трех племенных хозяйств Украины, а именно ОАО «Донрыбкомбинат» Донецкой обл. (n=14 ос. б. т.; n=12 ос. п. т.), Лиманское ГПСРП, Харьковской обл. (n=12 ос. б. т.; n=12 ос. п. т.), ГП рыбхоз «Галицкий» Ивано-Франковской обл. (n=14 ос. б. т.; n=15 ос. п. т.).

ДНК выделяли согласно стандартной методике с использованием набора Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (США). Концентрацию и качество ДНК определяли на биофотометре Eppendorf Bio Photometr.

Для исследования генетической структуры стад толстолобиков было использовано три микросателлитных маркера: MFW 15, MFW 23, MFW06 [7].

Таблица 1. **Микросателлитные маркеры**

Маркер	Последовательность праймеров
MFW 15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R: GTTCACAAGGTCATTTCCAGC
MFW 23	F:GTATAATTGGGAGTTTTAGGG R:CAGGTTTATCTCCCTTCTAG
MFW06	F: ACCTGATCAATCCCTGGCTC R:TTGGGACTTTTAAATCACGTTG

Исследования проводили на амплификаторе «Termo scientific» в следующем температурном режиме: 5 мин. при 94 ^{0}C, 33 цикла: 1 мин. при 94 ^{0}C, 30 с при 53–56 ^{0}C (в зависимости от локуса), 30 с при 72 ^{0}C; 5 мин. при 72 ^{0}C. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ $(NH_4)\ 2SO_4$, 0,01 % Tween-20, 0,2 ммоль dNTP, 1 ед. Tag-полимеразы, 50 нг ДНК, 1,7 ммоль $MgCl_2$ и по 0,2 мкм праймеров.

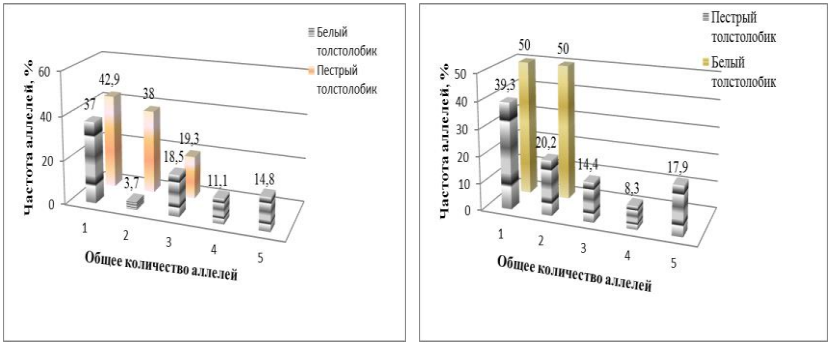
Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществляли в 2 % агарозном геле с использованием 1×TAE-буфера.

Обработку и анализ гелей проводили с помощью программы TotalLab v2.01. Частоту каждого ампликона по определенному локусу определяли как процент от общего количества ампликонов по данному

локусу [8]. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием компьютерных программ Biosys-1 и Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. При исследовании популяций белого и пестрого толстолобиков ОАО «Донрыбкомбинат», ГП рыбхоз «Галицкий» и Лиманское ГПСРП были проанализированы генотипы особей с использованием трех микросателлитных локусов: MFW 15, MFW 23, MFW 06.

По локусу MFW 15 у пестрого толстолобика из стада хозяйства «Донрыбкомбинат» нами было определено 3 аллельных варианта: 63 пары оснований (п. о.), встречавшихся с частотой 42,86 %, 158 п. о. – 38,00 %, и 293 п. о. – 19,29 %. При использовании маркера MFW 23 было обнаружено 5 аллелей – 82 п. о., частота которых составляла 39,3 %, 123 п. о. – 20,16 %, 138 п. о. – 14,35 %, 248 п. о. – 8,30 % и 265 п. о. – 17, 89 % (рис. 1.).



А Б

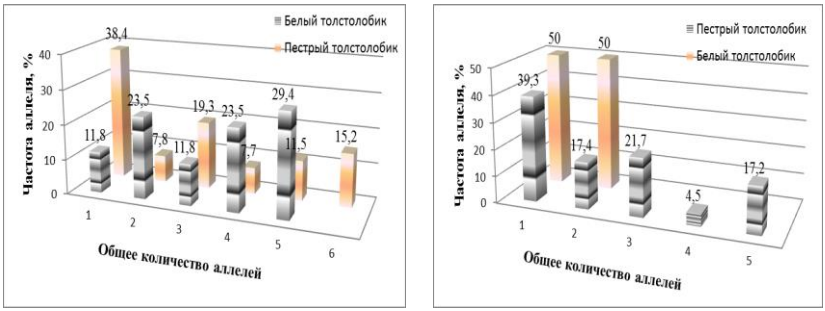
Рис. 1. Общее количество и частота аллельных вариантов в группах пестрого и белого толстолобиков ОАО «Донрыбкомбинат» при использовании микросателлитного маркера MFW 15 (А) и MFW 23 (Б)

У белого толстолобика по локусу MFW 15 было определено 6 аллельных вариантов: 78 п. о. – встречался с частотой 37 % (обнаружен у 100 % исследованных особей), 153 п. о. – 3,70 %, 197 п. о. – 18,52 %, 252 п. о.– 11,11 %, а также аллеля в 171 п. о. и 270 п. о. с частотой 14,81 % (обнаружены у 40 % исследованных особей). Аналогичный анализ, проведенный с применением праймера MFW 23, показал, что он является малоинформативным. По данному праймеру

определено 2 аллеля длиной 85 п. о. и 153 п. о., присутствовавших в 100 % исследованных особей белого толстолобика (рис. 1).

По микросателлитному маркеру MFW 6 при исследовании генетической структуры толстолобиков из стад «Донрыбкомбинат» было определено по 2 аллеля встречавшихся у 100 % исследованных особей обоих видов.

Анализ исследований, проведенных при использовании праймера MFW 15, показал наличие 5 аллельных вариантов у белого толстолобика из ГП рыбхоз «Галицкий»: 85 п. о. и 153 п. о., которые встречались у 20 % особей с частотой 11,76 %; 186 п. о. и 201 п. о. определены у 40 % особей с частотой 23,53 %. Аллель в 113 п. о. с частотой 29,42 % присутствовал у 50 % исследованных особей (рис. 2).



А Б

Рис. 2. Общее количество и частота аллелей у особей пестрого и белого толстолобиков из популяций ГП рыбхоз «Галицкий» при использовании микросателлитного маркера MFW 15 (А) и MFW 23 (Б)

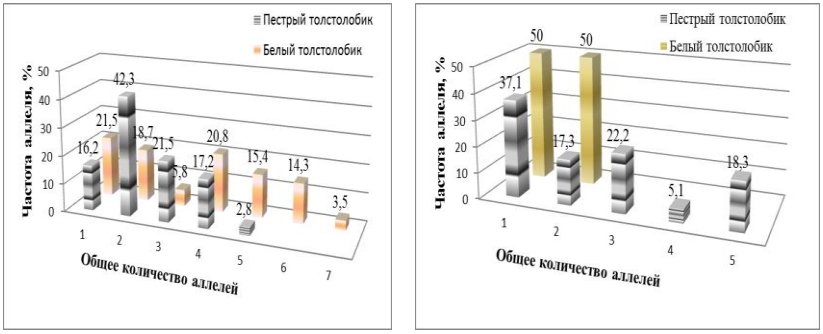
По локусу MFW 15 у пестрого толстолобика было установлено 6 аллельных вариантов: 174 п. о., с частотой встречаемости 38,41 %, 271 п. о. – 7,79 %, 337 п. о. – 19,33 %, 386 п. о.– 7,69 %, 415 п. о. – 11,54 % и 472 п. о. – 15,24 % (рис. 2.).

Исследования, проведенные с использованием маркера MFW 23 для белого толстолобика, показали его низкую информативность: по данному праймеру у 100 % особей было обнаружено 2 аллеля – 230 п. о. и 310 п. о. При использовании праймера MFW 23 в исследованиях с пестрым толстолобиком было выявлено 5 аллелей – 82 п. о., частота которых составляла 39,3 %, 141 п. о. – 19,45 %, 153 п. о. – 22,15 %, 212 п. о – 4,35 % и 261 п. о. – 14,75 % (рис. 2).

В результате проведенных исследований с использованием микросателлитного локуса MFW 6 для особей толстолобика из племенного рыбхоза «Галицкий» было установлено, что данный праймер малоинформативен.

При анализе генетической структуры популяций белого и пестрого толстолобиков из хозяйства «Лиманское» посредством микросателлитных ДНК-маркеров было выявлено 19 аллельных вариантов. Так, по локусу MFW 15 у пестрого толстолобика определено 5 аллелей: 158 п. о с частотой 16,2 %; 174 п. о – 42,3 %; 208 п. о. обнаружено с частотой 21,5 % у 40 % исследованных особей; 132 п. о. с частотой 17,2 % и аллель 254 п. о. выявлено у 10 % особей с частотой 2,8 % (рис. 3).

У белого толстолобика по данному локусу определено 7 аллелей: 80 п. о. с частотой 21,5 % были выявлены у 40 % особей; 142 п. о. с частотой 18,7 % (10 % особей); 153 п. о с частотой 5,8 %; 160 п. о. – 20,8 %, 246 п. о – 15,4 %; 252 п. о. – 14,3 % и аллель в 270 п. о. определено с частотой 3,5 % у 10 % особей (рис. 3).



А Б

Рис. 3. Общее количество и частота аллелей у особей пестрого и белого толстолобиков из популяций Лиманское ГПСРП при использовании микросателлитного маркера MFW 15 (А) и MFW 23 (Б)

По микросателлитному локусу MFW 23 у белого толстолобика определено 2 аллельных варианта: 230 п. о. и 253 п. о. с частотой 50 % (обнаружены у 100 % рыб). У пестрого толстолоба по данному локусу определено 5 аллелей:138 п. о. с частотой 37,13 %, 141 п. о. – 17,30 %, 153 п. о. – 22,15 %, 200 п. о. – 5,12 % и фрагмент ДНК длиной 212 п. о. обнаружено с частотой 18,3 % (рис. 3).

Исследования, проведенные с использованием микросателлитного локуса MFW 6 у толстолобиков из популяции «Лиманское», показали его низкую информативность для анализа генетической структуры этих рыб.

Как известно, локус, который может находится в двух или более аллельных состояниях, называется полиморфным, а отношение количества полиморфных к общему числу рассмотренных локусов является традиционной количественной мерой изменчивости внутривидового генома [9]. В природе основной движущей силой полиморфизма внутри популяции являются мутации. В случае с искусственно созданными популяциями, еще одним фактором, влияющим на уровень изменчивости, является селекционное давление, роль которого сегодня однозначно не установлена. Известно, что отбор, направленный на воспроизведение отдельных признаков, приводит к потере ряда аллелей, но в то же время особи из высокопродуктивных стад демонстрируют значительный рост уровня полиморфизма по сравнению с исходными линиями [10].

Анализ данных показал, что наиболее полиморфным оказался локус MFW 15: у белого толстолобика из популяции «Лиманское» идентифицировано 7 аллелей на локус, а у пестрого толстолобика из стад рыбхоза «Галицкий» идентифицировано 6 аллелей на локус. Сравнительно консервативным был локус MFW 23: в трех популяциях белого толстолобика определено по 2 аллеля, а у популяций пестрого толстолобика – по 5 аллельных вариантов. Согласно полученным данным, для исследованных популяций локус MFW 06 оказался мономорфным. По нашему мнению, это может быть связано с малыми размерами ампликонов, которые трудно идентифицировать в 2 % агарозном геле. В дальнейшем, мы планируем продолжить наши исследования с использованием полиакриламидного геля [3, 5].

При сравнении трех популяций пестрого толстолобика по микросателлитному локусу MFW 15 выявлено наличие двух общих аллельных вариантов. Так, аллель 158 п. о. встречался почти с одинаковой частотой (38,00 % и 38,41 %) у особей популяций «Донрыбкомбинат» и «Лиманское», а аллельные варианты 174 п. о. определялись с различными частотами в популяциях из рыбхоза «Галицкий» и «Лиманское». По локусу MFW 23 было установлено наличие аллельного варианта 82 п. о. для стад из «Донрыбкомбинат» и «Галицкий», встречавшегося в обеих популяциях с одинаковой частотой (39,3 %). Общим для двух из трех популяций пестрого

толстолобика по данному локусу оказался и аллель 141 п. о., который встречался в стадах племенного хозяйства «Лиманское» и рыбхоза «Галицкий» с одинаковой частотой 17,3 %. При сравнении стад белого толстолобика по локусу MFW 15 также были определены общие аллельные варианты: 153 п. о. выявлено у особей во всех исследованых популяциях и 254 п. о. – в «Донрыбкомбинат» (11,11 %) и «Лиманское» (14,3 %).

В результате исследований трех популяций белого и пестрого толстолобика по микросателлитным локусам выявлены различия в генетической структуре спектров аллелей. У белого толстолобика наибольшее среднее количество аллелей наблюдалось в популяции «Лиманское» (4,5 аллельных вариантов на локус). Популяции из рыбхоза «Галицкий» и «Донрыбкомбинат» характеризуются меньшими значениями среднего количества аллельных вариантов на локус – 3,5 и 4,0, соответственно. Среди популяций пестрого толстолобика максимальное среднее количество аллелей было обнаружено в хозяйстве «Галицкий» (5,5 аллельных вариантов на локус). В популяциях «Донрыбкомбинат» и «Лиманское»эти значения составляли 4,0 и 4,5 аллелей соответственно.

Таким образом, в результате оценки информативности серии праймеров было показано, что для исследования генетической структуры белого и пестрого толстолобиков наиболее целесообразным является использование микросателлитного маркера MFW 15. Маркер MFW 23 информативен для исследований генетической структуры только пестрого толстолобика. Маркер MFW 6 оказался малоинформативным, хотя и предоставляет некоторые сведения о генетической структуре популяции. Можно утверждать, что данный метод анализа микросателлитных локусов ДНК вполне пригоден для популяционного генотипирования и анализа филогенетических связей видов белого и пестрого толстолобиков.

Результаты проведенных исследований с использованием методик на основе полиморфизма ДНК-маркеров показали, что для индивидуального генотипирования необходимо подбирать высокоспецифичные маркеры, позволяющие выявлять наличие полиморфизма на уровне особей. Использованные нами праймеры не предоставляли возможности провести индивидуальное типирование по специфичности спектров аллелей, хотя и позволяют провести исследования в области видовой идентификации. Примененная в работе методика перспективна в аспекте использования оптимальных

SSR молекулярно-генетических маркеров для последующих популяционно-генетических исследований толстолобика.

Заключение. Исследованы особенности генетической структуры белого и пестрого толстолобиков из стад племенных хозяйств Украины с использованием микросателлитных маркеров MFW 15, MFW 23 и MFW 06. Для особей пестрого толстолобика выявлено наличие двух общих аллельных вариантов 158 п. о. и 174 п. о. по маркеру MFW 15, а также аллелей 82 п. о. и 141 п. о. по маркеру MFW 23. При сравнении генетической структуры стад белого толстолобика по маркеру MFW 15 определено общие аллельные варианты 153 п. о. и 254 п. о. Среди использованных праймеров наиболее пригодным для популяционного генотипирования видов белого и пестрого толстолобика определен маркер MFW 15: для белого толстолобика идентифицировано 18 аллелей на локус, для пестрого – 14 аллелей на локус.

ЛИТЕРАТУРА

1. А й а л а, Ф. Современная генетика. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 335 с.

2. Д у б і н, О. В. Мікросателітні маркери у дослідженні генетичного поліморфізму російського осетра / О. В. Дубін // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – 2012. – Вип. 4, т. 2, ч. 1. – С. 70–73.

3. С л у к в и н, А. М. Генетическая идентификация стерляди, выращенной в ОАО «Рыбхоз «Полесье»» Пинского района Брестской области, по микросателлитным маркерам / А. М. Слуквин, О. Ю. Конева, М. И. Лесюк // Молекулярная и прикладная генетика. – 2009. – Т. 9. – С. 146–152.

4. Т а р а с ю к, С. І. Молекулярно-генетичні дослідження в рибництві. / С. І. Тарасюк, І. І. Грициняк. – Київ: Аграрна наука, 2013. – 310 с.

5. C r o o i j m a n s, R. Mikrosatellite markers in common carp (Cyprinus carpio L.) / R. Crooijmans, V. Bierbooms, J. Komen // Animal Genetics. – 1997. – V. 28. – P. 129–134.

4. G h e y a s, A. A. Characterization of microsatelllite loci in silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) and cross-amplification in other cyprinid species / A. A. Gheyas, M. A. Cairney, A. E. Gilmour // Molecular Ecology Notes (Accepted). – 2006. – № 3. – P. 455–461.

5. P o r t a, J. Development of a microsatellite genotyping tool for the fish Gilthead seabream (Sparus aurata): applicability in population genetics and pedigree analysis./ J. Porta, J. Maria Porta, J. Bejar // Aquaculture Research. – 2010. – № 41. – P. 1514-1522.

6. T o n g, J. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatelllite primers of common carp / J. Tong, Z. Wang, X. Wu // Molecular Ecology Notes. – 2002. – № 2. – P. 245–247.

7. X u, D. Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish Oplegnathus fasciatus, with emphasis of their distribution in the neo–Y chromosome / D. Xu, B. Lou, L. Antonio Carlos Bertollo // Molecular Cytogenetics. – 2013. – № 6. – P. 1755–1766.

8. Y a n g, J. Isolation and characterization of microsatellite loci in the fish Coilia mystus (Clupeiformes: Engraulidae) using PCR–based isolation of microsatellite arrays. / J. Yang, X. Zhou, D. Liu // Genet Mol Res. – 2011. – №10(3). – P. 1514–1517.