

## ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БЕЛОГО (*HYRORPHTHALMICHTHYS MOLITRIX VAL.*) И ПЕСТРОГО (*HYRORPHTHALMICHTHYS NOBILIS RICH.*) ТОЛСТОЛОБИКОВ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В АКВАКУЛЬТУРЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ, НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

А.Ю. НОСОВА, В.Н. КИПЕНЬ, А.И. ЦАРЬ, В.А. ЛЕМЕШ

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, 220072

E-mail: a.nosova@igc.by, v.kipen@igc.by, a.tsar@igc.by, v.lemesh@igc.by

В работе дана оценка генетического разнообразия белого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобиков, разводимых на территории Республики Беларусь, по данным генотипирования 11 STR-локусов – Нто11, Нто13, Нто15, Нто25, Нто26, Нто31, Нто33, Нто34, Нто36, Нто37, Нто40. Рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на локус, эффективное число аллелей, уровни ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона и индекс фиксации  $F_{IS}$ . Полученные результаты свидетельствуют об умеренном (для пестрого толстолобика) и достаточно высоком (для белого толстолобика) генетическом разнообразии изученных выборок, вплоть до возможности выделить несколько групп для последующей работы по получению линейного материала и дальнейшего воспроизводства. Для достижения данных целей стоит уделить особое внимание подбору пар производителей с учетом результатов молекулярно-генетического анализа. Оценка генетического разнообразия данных видов растительноядных рыб, разводимых в Республике Беларусь, в сравнении с результатами других исследователей свидетельствует о значительном генетическом ресурсе отечественных производителей.

**Ключевые слова:** белый толстолобик, *Hypophthalmichthys molitrix Val.*, пестрый толстолобик, *Hypophthalmichthys nobilis Rich.*, микросателлитные локусы, short tandem repeat (STR), аллель, индекс фиксации  $F_{IS}$

**Введение.** Дальневосточные растительноядные рыбы – экологическая группа видов, потребляющих первичную продукцию водоемов (фитопланктон и высшую водную растительность). К ним относятся белый (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрый (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобики, которые исторически являются коренными обитателями рек Централь-

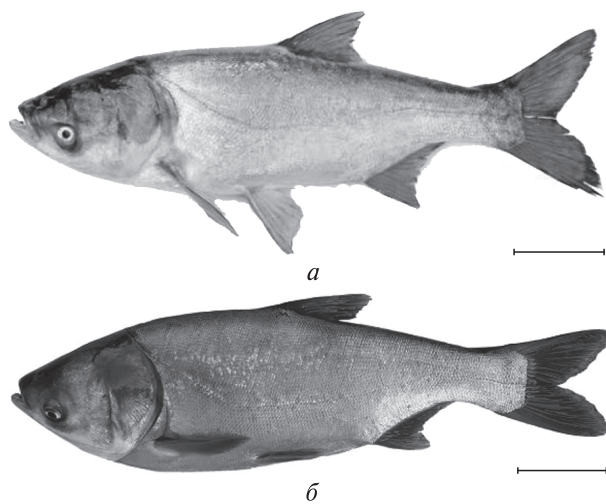
ных и Южных провинций КНР (рисунок). Растительноядные рыбы обладают ярко выраженной экологической пластичностью и высокими товарными качествами, по этой причине они акклиматизированы во многих странах мира. В производимой в аквакультуре рыбной продукции растительноядные рыбы занимают 18,6 % от продукции общемировой аквакультуры или 29,0 % от общемировой аквакультуры в пресной воде [1].

В мире производство в аквакультуре белого толстолобика (БТ) опережает прочие виды рыб [2]. В 2014 г. объемы производства достигли почти 5 млн. тонн при стоимости более 6,5 млрд. долларов США [1, 3]. В условиях сбалансированного и полноценного питания в аквакультуре БТ может достигать массы 25–30 кг, при этом он питается фитопланктоном и практически не требует внесения больших объемов комбикормов. Быстрый темп роста, который может быть достигнут при относительно низких финансовых затратах, и возможность выращивания в аквакультуре совместно с другими видами делает этот вид экономически привлекательным. Однако до сих пор недостаточно известно о генетике качественных и количественных признаков толстолобика, что вызвано, в первую очередь, лишь недавним появлением генетических карт сцепления с высоким разрешением [4, 5], и реализацией проектов по секвенированию геномов белого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобиков в 2015–2017 гг. (NCBI BioProject ID – PRJNA345212, PRJNA329018, PRJNA305145 PRJNA305140, PRJNA313394, PRJNA305141). Локусы количественных признаков (QTL, Quantitative Trait Loci) имеют

важное значение для успешной селекции, и недостаток подобной информации является серьезной проблемой при планировании программ разведения [3].

Пестрый толстолобик (ПТ) — один из самых важных видов растительноядных рыб в аквакультуре [2]. По данным ФАО (FAO, Food and Agriculture Organization), в 2014 г. глобальный годовой объем производства ПТ составил почти 3,3 млн. тонн [1]. Пестрый толстолобик — фильтратор, но, в отличие от белого, в основном предпочитает зоопланктон. В условиях сбалансированного и полноценного питания масса ПТ в аквакультуре может достигать 35–40 кг. Благодаря быстрому росту и простоте содержания он был интродуцирован в более чем 20 странах для контроля качества воды, а также в качестве промыслового вида. В то же время, естественные популяции ПТ серьезно сократились в последние десятилетия в связи с активной человеческой деятельностью (загрязнение окружающей среды, строительство плотин, чрезмерный вылов рыбы и т.п.). Кроме того, естественные популяции представлены смесью диких и культивируемых особей из-за частых наводнений и неконтролируемого высвобождения из условий искусственного содержания, что привело к депрессии и снижению показателей роста [5].

В настоящее время ПТ широко акклиматизирован в европейской части СНГ (дельта и водохранилища Волги, низовья и водохранилища Днепра, Прут и придунайские водоемы, Днестр, Кубань, Дон, Терек, Амударья, Сырдырья, Балхаш-Илийский бассейн и др). В Республике Беларусь работы по акклиматизации растительноядных рыб были начаты в 1963 г., когда исходные ремонтно-маточные стада были завезены из Казахстана. Из их потомства впоследствии было сформировано сегодняшнее ремонтно-маточное стадо в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец»». Однако при акклиматизации и одомашнивании в искусственных условиях диких видов рыб могут наблюдаться генетические и морфофизиологические изменения, вызванные инбридингом, снижается их гетерозиготность и жизнестойкость, что значительно снижает рыбоводные результаты [6]. При искусственном воспроизводстве наблюдается сни-



Внешний вид белого (а) и пестрого (б) толстолобиков

жение уровня полиморфизма за счет эффекта основателя и инбридинга, для контроля которых, а также для оценки генетического разнообразия белого и пестрого толстолобиков широко используется полиморфизм STR-локусов [7–10].

Цель настоящего исследования — оценить генетическое разнообразие белого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобиков, разводимых в аквакультуре на территории Республики Беларусь, по данным генотипирования 11 STR-локусов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили образцы тканей от 129 производителей растительноядных рыб (ПТ — 63 особи, БТ — 66 особей) и от 90 сеголетков (ПТ — 61, БТ — 29), отобранных в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец»». Сеголетки ПТ были получены от двух пар производителей, выборка сеголетков БТ — от одной.

В качестве биологических проб для молекулярно-генетических исследований использовались фрагменты живой рыбы (плавники, мышечная ткань, кровь и др.), охлажденной или мороженой рыбы (плавники, мышечная ткань и др.). Для каждого образца осуществлялся забор не менее двух проб объемом 2–3 см<sup>3</sup> каждая. Пробу помещали в пробирку, маркированную в соответствии с протоколом отбора.

В зависимости от типа образца, для длительного хранения проб применялись несколько способов фиксации: использовали 96 % этиловый спирт для плавников и мышечной ткани; кровь помещали в пробирки с антикоагулянтом, тщательно перемешивали и транспортировали при низкотемпературных условиях. Долговременное хранение проб при любом способе фиксации осуществляли при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$ . Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Выделение тотальной ДНК проводилось с использованием коммерческих наборов «DNA Purification Kit» (ThermoFisher Scientific®, США), «ДНК-сорб-С» (AmpliSens®, РФ), а также методик фенол-хлороформной и соле-

вой экстракции [11] с модификациями. В ходе оптимизации методики выделения ДНК из рыбного сырья был разработан подход, который представлял собой комбинированный протокол фенол-хлороформной и солевой экстракции тотальной ДНК, для которого нами было подобрано оптимальное соотношение ионогенных и неионогенных детергентов в лизирующем буфере.

Проведен анализ разнообразия аллелей по одиннадцати STR-локусам – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40 [9–10] (табл. 1).

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер для Taq-полимеразы (650 мМ Трис-НСl, 166 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 % Твин 20, рН = 8,8), 0,2 мМ дНТФ, 2,5 пМ каждого праймера, 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 ед. High-

Таблица 1. Информация об используемых в исследовании STR-локусах

STR-локус	Последовательность, 5' > 3'	Аллельный диапазон	Флуоресцентная метка	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$
Hmo11	F: CTGCTTGATCACAGGGTTTG	148–221	FAM	55,5
	R: CCTTACAGATAGACAGATATTCAG	141–158		
Hmo13	F: AAACCTGGAAGATGTTCACTGAAT	140–171	R6G	55,5
	R: GCGCGAGTGTGTTGAAGTCTG	146–174		
Hmo15	F: TCCTGGAACAGAACCCACTGA	139–148	FAM	59,0
	R: ATTCGTGCACCATCGCTAAAG	139–160		
Hmo25	F: TGTGCTGCATTTTCACTTCA	146–246	R6G	57,0
	R: TTCTTACTATCCACATTTGTTGTATG	142–214		
Hmo26	F: GATTCAGGCACATTGCTTATCT	177–298	TAMRA	57,0
	R: GAGCGTTTCTCATTTGTACTTATTTT	143–225		
Hmo31	F: TCCACAGAAGAAAGAAAGTCT	141–183	ROX	59,0
	R: CTCAGAGGAAGGAGATGCT	131–221		
Hmo33	F: GTGCAGCAGTATGTGAATCAGGACAC	76–132	FAM	57,0
	R: GTGCTTCGGGATACCACACTCTTG	86–118		
Hmo34	F: GTTCCCTGAGGCTTTACAA	117–129	ROX	55,5
	R: GGGTCATTATCCTCTCACTTT	115–134		
Hmo36	F: ATCGGAGGAGTGCTGTTCACTGCTGGA	139–221	R6G	57,0–59,0
	R: ACGATTGTTGCCGAACGGGTTGAT	139–217		
Hmo37	F: CACAGCGGAGGGGCAAAGGTC	132–174	TAMRA	55,5
	R: GGACGCCGTGTGACTGGAGATTTT	148–191		
Hmo40	F: CAGGCAGGCATCCACATAGAGAATC	210–250	ROX	57,0–59,0
	R: AGAAGAAATCTGATCGTCACCTATGA	207–248		

Примечание. \* первый диапазон выявлен среди производителей ПТ, второй – среди производителей БТ.

Fidelity ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех»), 10–20 нг исследуемой ДНК. Температурный режим соответствовал приведенному в [10]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «ABI RISM 3500 Genetic analyzer» относительно маркера молекулярного веса Orange 500 DNA Size Standard (Nimagen), определение длин аллелей осуществляли с использованием программного обеспечения GeneMarker 5.

С использованием GenAlEx v.6.5 [12] были рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на locus ( $N_a$ ), эффективное число аллелей ( $N_e$ ), уровни ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона ( $I$ ), индекс фиксации ( $F_{IS}$ ).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Современные производители растительноядных рыб – белого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобиков, разводимых в Республике Беларусь, обнаруживают довольно высокий уровень внутривидовой фенотипической вариативности, однако об уровне генетической вариативности информация отсутствовала.

Нами установлено, что для производителей ПТ в 11 исследованных STR-локусах было идентифицировано 73 аллеля, для БТ – 108 аллелей. Число аллелей в каждом локусе варьировало от 2 до 15 для ПТ и от 6 до 14 для БТ, при среднем значении  $6,636 \pm 1,038$  и  $9,818 \pm 0,761$  аллелей на locus, соответственно (табл. 2).

Для сеголетков аллельное разнообразие было менее выраженным: для ПТ выявлено 53 аллеля (в садке № 57, ПТ-57) и 44 аллеля (в садке № 60, ПТ-60), для БТ – 65 аллелей (в садке № 52, БТ-52). Число аллелей в каждом локусе варьировало от 1 до 12 для ПТ-57 и от 2 до 8 для ПТ-60, при среднем значении  $4,818 \pm 0,923$  и  $4,000 \pm 0,467$  аллеля на locus соответственно. Среди сеголетков БТ число аллелей в каждом локусе варьировало от 3 до 9, при среднем значении  $5,909 \pm 0,547$  аллеля на locus (табл. 2).

Для производителей ПТ наибольшее число аллелей наблюдалось в локусах Hmo26, Hmo25 и Hmo31, для БТ – в локусах Hmo37, Hmo26,

Hmo33, Hmo25 и Hmo36. Среди сеголетков ПТ STR-locus Hmo26 также был наиболее полиморфных из всех 11 локусов, было выявлено 12 (для ПТ-57) и 8 (для ПТ-60) аллелей. Среди сеголетков БТ наиболее полиморфными оказались STR-locuses Hmo37, Hmo26 и Hmo33 (табл. 2).

Также установлено, что некоторые locus с большим числом наблюдаемых аллелей характеризуются сравнительно невысоким значением такого показателя, как число эффективных аллелей ( $N_e$ ). В частности, для высоко полиморфного у производителей ПТ STR-locusa Hmo25 число эффективных аллелей оказалось равным 2,098, для Hmo31 – 2,522. Аналогично, для полиморфного у производителей БТ STR-locusa Hmo15 число эффективных аллелей – 1,517. Данный факт объясняется наличием в локусах редких аллелей с частотой встречаемости менее 5,0 %. В частности, у производителей ПТ нами было идентифицировано 29 редких аллеля (или 39,73 % от всех выявленных аллелей), у БТ – 50 (46,30 %) аллелей. Для ПТ число эффективных аллелей в локусах значительно варьировало – от 1,136 (Hmo33) до 6,751 (Hmo26), при среднем значении  $3,054 \pm 0,488$  аллеля на locus. Аналогичные параметры для производителей БТ – диапазон значений составил от 1,517 (Hmo15) до 11,211 (Hmo37), при среднем значении  $4,888 \pm 0,805$  аллеля на locus. Таким образом, число эффективных аллелей в 11 исследуемых STR-locuses было выше для БТ, чем для ПТ.

Индекс биоразнообразия Шеннона ( $I$ ) отражает сложность структуры сообщества, основываясь на количественной представленности объектов в популяции (он может изменяться от 0 до 5). Значение индекса  $I$ , рассчитанного для совокупности 11 STR-locuses, составляет  $1,209 \pm 0,158$  для производителей ПТ и  $1,716 \pm 0,142$  для производителей БТ, что указывает на среднюю сложность структуры сообществ исследованных видов (табл. 3). Однако для БТ значение индекса  $I$  несколько выше, данный факт подтверждает полученные ранее результаты по аллельному разнообразию и позволяет сделать заключение о более выраженном генетическом разнообразии среди производителей БТ в сравнении с ПТ.

Таблица 2. Генетическая характеристика производителей и сеголетков ПТ и БТ по 11 STR-локусам ДНК

STR	Hmo11	Hmo13	Hmo15	Hmo25	Hmo26	Hmo31	Hmo33	Hmo34	Hmo36	Hmo37	Hmo40
<i>ПТ (производители *)</i>											
Na	7	7	2	9	15	8	5	4	7	5	4
Ne	4,841	2,560	1,973	2,098	6,751	2,522	1,136	2,032	4,320	2,885	2,475
I	1,661	1,177	0,686	1,213	2,263	1,284	0,311	0,821	1,595	1,258	1,025
Ho	0,650	0,225	0,000	0,370	0,575	0,333	0,104	0,025	0,953	0,400	0,047
He	0,793	0,609	0,493	0,523	0,852	0,603	0,120	0,508	0,769	0,653	0,596
uHe	0,803	0,617	0,499	0,529	0,863	0,611	0,121	0,514	0,778	0,662	0,603
F <sub>IS</sub>	0,181	0,631	1,000	0,294	0,325	0,448	0,130	0,951	-0,241	0,388	0,922
PE	0,642	0,354	0,230	0,403	0,747	0,413	0,097	0,269	0,609	0,443	0,353
<i>ПТ-57 (сеголетки, 57 садок)</i>											
Na	3	6	1	3	12	7	3	5	3	7	3
Ne	2,442	3,290	1,000	2,301	5,262	2,691	1,232	1,690	2,386	2,859	1,192
I	0,981	1,397	0,000	0,952	1,993	1,333	0,379	0,810	0,957	1,359	0,352
Ho	0,556	0,731	0,000	0,517	1,000	0,586	0,207	0,214	0,655	0,556	0,034
He	0,591	0,696	0,000	0,565	0,810	0,628	0,188	0,408	0,581	0,650	0,161
uHe	0,602	0,710	0,000	0,575	0,825	0,639	0,192	0,416	0,591	0,662	0,164
F <sub>IS</sub>	0,059	-0,050	-	0,085	-0,235	0,067	-0,098	0,475	-0,128	0,146	0,786
<i>ПТ-60 (сеголетки, 60 садок)</i>											
Na	3	3	2	4	8	4	4	3	4	5	4
Ne	2,826	1,456	1,430	1,205	4,699	1,956	3,267	1,909	1,857	4,083	2,527
I	1,069	0,543	0,478	0,399	1,734	0,904	1,272	0,725	0,906	1,480	1,082
Ho	0,833	0,379	0,368	0,182	0,864	0,182	0,895	0,733	0,381	0,897	0,714
He	0,646	0,313	0,301	0,170	0,787	0,489	0,694	0,476	0,461	0,755	0,604
uHe	0,657	0,319	0,309	0,174	0,805	0,500	0,713	0,484	0,473	0,768	0,619
F <sub>IS</sub>	-0,290	-0,211	-0,226	-0,067	-0,097	0,628	-0,289	-0,540	0,174	-0,187	-0,182
<i>БТ (производители *)</i>											
Na	6	9	8	11	12	10	12	9	11	14	6
Ne	3,215	7,205	1,517	3,452	5,147	4,990	6,324	4,556	3,727	11,211	2,423
I	1,422	2,056	0,821	1,575	1,979	1,914	2,064	1,755	1,662	2,502	1,123
Ho	0,490	0,784	0,227	0,238	0,615	0,714	0,825	0,571	0,955	0,680	0,429
He	0,689	0,861	0,341	0,710	0,806	0,800	0,842	0,781	0,732	0,911	0,587
uHe	0,696	0,870	0,345	0,719	0,816	0,809	0,853	0,789	0,740	0,920	0,594
F <sub>IS</sub>	0,289	0,089	0,333	0,665	0,236	0,107	0,020	0,268	-0,305	0,253	0,270
PE	0,446	0,703	0,198	0,491	0,633	0,641	0,693	0,600	0,516	0,803	0,352
<i>БТ-52 (сеголетки, 52 садок)</i>											
Na	6	5	3	6	8	6	8	4	5	9	5
Ne	3,645	2,641	2,280	3,005	5,261	3,388	5,365	1,505	2,156	6,969	1,572

STR	Hmo11	Hmo13	Hmo15	Hmo25	Hmo26	Hmo31	Hmo33	Hmo34	Hmo36	Hmo37	Hmo40
<i>БТ-52 (сеголетки, 52 садок)</i>											
I	1,475	1,125	0,904	1,309	1,819	1,438	1,850	0,664	1,092	2,037	0,778
No	0,704	0,741	0,654	0,360	0,615	0,840	1,000	0,143	0,577	0,821	0,385
Ne	0,726	0,621	0,561	0,667	0,810	0,705	0,814	0,335	0,536	0,857	0,364
uHe	0,739	0,633	0,572	0,681	0,826	0,719	0,830	0,342	0,547	0,872	0,371
F <sub>IS</sub>	0,030	-0,192	-0,165	0,460	0,240	-0,192	-0,229	0,574	-0,076	0,041	-0,057

*Примечание.* \* По результатам генотипирования 11 STR-локусов в анализируемой выборке отсутствуют гибридные особи Na (No. of Different Alleles) – количество выявленных аллелей, Ne (No. of Effective Alleles) – количество эффективных аллелей, I (Shannon's Information Index) – информационный индекс Шеннона, No (Observed Heterozygosity) – наблюдаемая гетерозиготность, He (Expected Heterozygosity) – ожидаемая гетерозиготность, uHe (Unbiased Expected Heterozygosity) – скорректированная ожидаемая гетерозиготность, FIS (Fixation Index) – индекс фиксации, PE (Probability of Exclusion) – вероятность исключения (генотипы обоих родителей известны).

Наименьшие значения показателя наблюдаемой гетерозиготности (No) для производителей ПТ были отмечены для Hmo15 (при генотипировании выявлены только гомозиготные особи), Hmo34 и Hmo40, для производителей БТ – для Hmo15 и Hmo25 (табл. 2). Данный факт свидетельствует о незначительной вариабельности генетических признаков в данных локусах, однако, при условии того факта, что для ПТ и БТ могут быть представлены различные аллельные варианты, значимость генотипирования по данным STR-локусам возрастает, если необходимо дифференцировать ПТ и БТ, а также гибридные особи. Но, в тоже время, данные локусы показали наименьший дифференцирующий потенциал при решении возможной задачи по установлению родственных связей между производителями и сеголетками. Для этой задачи необходимо использовать STR-локусы с высокими значениями No, которые свидетельствует о значительной вариабельности генетических признаков: для ПТ – Hmo26, Hmo11, Hmo36; для БТ – Hmo13, Hmo33, Hmo36 (табл. 2). Полученные результаты могут быть использованы для проведения вероятностно-статистической обработки выявленных генетических признаков при идентификации особи и/или с целью установления родства – рассчитанные значения вероятности исключения PE (анг. Probability of Exclusion) для каждого STR-

локуса приведены в табл. 2. Рассчитанная совокупная средняя вероятность исключения CPE (анг. Cumulative average probability of exclusion) с использованием 11 STR-локусов для производителей ПТ составила 0,998, для производителей БТ – 0,999.

**Таблица 3. Генетическая характеристика двух выборок производителей по результатам генотипирования 11 STR-локусов (ПТ – пестрый толстолобик, БТ – белый толстолобик)**

Параметр	Выборка		p-уровень
	ПТ	БТ	
Na	6,636 ± 1,038	9,818 ± 0,761	<0,00001
Ne	3,054 ± 0,488	4,888 ± 0,805	0,00014
I	1,209 ± 0,158	1,716 ± 0,142	0,00605
No	0,335 ± 0,091	0,594 ± 0,070	<0,00001
He	0,593 ± 0,059	0,733 ± 0,048	<0,00001
F <sub>IS</sub>	0,457 ± 0,117	0,202 ± 0,072	<0,00001

*Примечание.* Na (No. of Different Alleles) – количество выявленных аллелей; Ne (No. of Effective Alleles) – количество эффективных аллелей; I (Shannon's Information Index) – информационный индекс Шеннона; No (Observed Heterozygosity) – наблюдаемая гетерозиготность; He (Expected Heterozygosity) – ожидаемая гетерозиготность; uHe (Unbiased Expected Heterozygosity) – скорректированная ожидаемая гетерозиготность; F<sub>IS</sub> (Fixation Index) – индекс фиксации.

$F_{IS}$  – индивидуальный индекс фиксации, который указывает на редукцию гетерозиготности из-за неслучайного спаривания и означает меру отклонения генотипических частот от таковых при HWE (Hardy–Weinberg equilibrium) внутри субпопуляций с точки зрения недостатка или избытка гетерозигот. При  $F_{IS} > 0$  имеет место дефицит гетерозиготных особей (родственное спаривание); при  $F_{IS} < 0$  – избыток гетерозигот (неродственное спаривание); при  $F_{IS} = 0$  – случайное спаривание. Наибольшие рассчитанные значения коэффициента  $F_{IS}$  для производителей ПТ были показаны для локусов Hmo15, Hmo34 и Hmo40 при среднем значении по 11 STR-локусам  $0,457 \pm 0,117$  (табл. 2). Для производителей БТ наибольшее значение  $F_{IS}$  выявлено для локуса Hmo25 при среднем значении  $0,202 \pm 0,072$  (табл. 2). Таким образом, среди производителей БТ отсутствует выраженная тенденция к снижению генетического разнообразия, что нельзя отметить для ПТ, для которых по трем из одиннадцати STR-локусам выявлен дефицит гетерозиготных особей, что может указывать на наличие процессов инбридинга или, что часто бывает при переносе маркеров с одного биологического вида на другой, может быть обусловлено элементарным отсутствием выраженного полиморфизма по данным STR-локусам у объекта-реципиента. В то же время, для производителей ПТ было выявлено 17

«приватных» аллелей (или 9,39 % от общего количества выявленных среди ПТ и БТ аллелей), для производителей БТ – 33 «приватных» аллеля (18,23 % от общего количества выявленных аллелей).

Для производителей БТ показатели среднего числа аллелей на локус, эффективного числа аллелей и значения информационного индекса Шеннона, уровни ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности статистически значимо выше, чем для ПТ (табл. 3). Коэффициент  $F_{IS}$  для производителей ПТ оказался ниже ( $p < 0,00001$ ), чем для БТ (табл. 3). Данные результаты позволяют сделать заключение, что генетическое разнообразие производителей БТ больше, чем для ПТ.

Нами проведен сравнительный анализ значений среднего количества аллелей на локус и наблюдаемой гетерозиготности для производителей ПТ и БТ, выращиваемых в аквакультуре в Республике Беларусь, с аналогичными параметрами, полученными рядом исследователей из Китая [13–17], США [18], Пакистана [19] и Бангладеша [10] (табл. 4).

Установлено, что для БТ из Беларуси среднее количество аллелей на локус (в контексте исследуемых в данной работе STR-локусов), было максимальным в сравнении с данными других исследователей и составило  $9,82 \pm 0,76$  (табл. 4). Данный факт может свидетельствовать как о значительной полиморфности ана-

Таблица 4. Генетическая характеристика выборок растительных рыб по результатам генотипирования STR-локусов (ПТ – пестрый толстолобик, БТ – белый толстолобик)

Вид (количество образцов)	Страна	Количество локусов	Среднее количество аллелей на локус	Наблюдаемая гетерозиготность (Ho)	Условия обитания	Ссылка
ПТ ( $n = 30$ )	Китай	16	$3,56 \pm 1,50$	$0,45 \pm 0,15$	естественные	[17]
ПТ ( $n = 63$ )	Беларусь	11	$6,64 \pm 1,04$	$0,34 \pm 0,09$	аквакультура	Данное исследование
БТ ( $n = 30$ )	Китай	27	$5,48 \pm 1,25$	$0,56 \pm 0,20$	естественные	
БТ ( $n = 72$ )	Китай	39	$5,55 \pm 0,82$	$0,80 \pm 0,04$	естественные	[14]
БТ ( $n = 41$ )	Китай	40	$7,43 \pm 3,16$	$0,64 \pm 0,20$	естественные	[15]
БТ ( $n = 30$ )	Китай	40	$9,35 \pm 4,01$	$0,74 \pm 0,17$	естественные	[16]
БТ ( $n = 240$ )	Пакистан	16	$5,18 \pm 0,64$	$0,51 \pm 0,06$	естественные	[19]
БТ ( $n = 48$ )	Бангладеш	16	$7,31 \pm 3,93$	$0,61 \pm 0,22$	аквакультура	[10]
БТ ( $n = 309$ )	США	10	$6,10 \pm 0,70$	$0,60 \pm 0,14$	естественные	[18]
БТ ( $n = 66$ )	Беларусь	11	$9,82 \pm 0,76$	$0,59 \pm 0,07$	аквакультура	Данное исследование

лизируемых нами STR-локусов (Hто из [10]), так и о потенциально высоком генетическом разнообразии изучаемой выборки БТ. В то же время, рассчитанный показатель наблюдаемой гетерозиготности для БТ из Беларуси составил  $0,59 \pm 0,07$  и оказался сопоставим со значениями, полученными в большинстве исследований [10, 13, 15, 18–19], (табл. 4). При этом в работах [13, 15, 18, 19] был проведен молекулярно-генетический анализ для БТ, обитающих в естественных условиях. Соответственно, полученные нами данные о генетическом разнообразии производителей БТ, выращиваемых в аквакультуре в Беларуси, позволяют сделать вывод о наличии значительного генетического ресурса, не уступающему для особей растительноядных рыб из их естественной среды обитания.

В отношении ПТ имелось лишь единственное исследование, посвященное анализу STR-локусов [17]. Среднее количество аллелей на locus в исследуемой нами выборке ПТ также превысило значение в сравнении с известными аналогами и составило  $6,64 \pm 1,04$ , однако показатель  $H_o$  оказался ниже для отечественных ПТ —  $0,34 \pm 0,09$  (табл. 4). Таким образом, для ПТ, выращиваемых в аквакультуре в Беларуси, имеет место схожая тенденция, показанная нами ранее для БТ: аллельное разнообразие исследуемых STR-локусов довольно высоко, а уровень наблюдаемой гетерозиготности сопоставим с результатами других исследователей.

**Выводы.** Исследования генетического разнообразия и быстрой адаптации интродуцированных видов дают важную информацию о причинах того, как чужеродные виды становятся инвазивными. В подобных условиях виды часто испытывают «эффект основателя» и демонстрируют снижение генетического разнообразия внутри популяций, а также усиление изоляции от прочих популяций. С другой стороны, высокий уровень генетического разнообразия был найден во многих популяциях, полученных в результате многократных интродукций, которые могут привести к повышению генетической изменчивости и появлению новых комбинаций генов в таких условиях. Адаптивная эволюция видов, привнесенных в

новые места обитания, часто сопровождается генетическими изменениями [5, 7]. Изучение генетической изменчивости в искусственных популяциях представляет интерес не только для фундаментальных исследований, но и практических при доместификации новых видов в условиях рыбного хозяйства. Несмотря на то, что изученные выборки белого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) толстолобиков, разводимые в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец»», можно считать в достаточно выраженной степени инбредными (с учетом истории селекции и разведения в Республике Беларусь), нами выявлены относительно высокие показатели наблюдаемой гетерозиготности как в популяции производителей БТ, так и сеголетков, а также умеренные показатели наблюдаемой гетерозиготности для ПТ. Учитывая, что сеголетки ПТ и БТ получены от малого числа производителей, умеренные (для ПТ) и средние (для БТ) показатели среднего числа аллелей на locus, эффективного числа аллелей, наблюдаемой гетерозиготности и значения информационного индекса Шеннона свидетельствует об имеющемся в распоряжении сотрудников селекционных станций генетическом ресурсе исследованных производителей. Сравнительный анализ генетического разнообразия ПТ и БТ, разводимых в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец»», с результатами аналогичных исследований [10, 13–19], позволяют сделать заключение, что отечественные производители данных видов растительноядных видов не уступают, а в некоторых случаях и превосходят по генетическому разнообразию своих сородичей. Предполагается провести дальнейший детальный анализ, вплоть до возможности выделить несколько групп для последующей работы по получению линейного материала и воспроизводства, в том числе, и товарной рыбы. В последующем, для достижения данных целей стоит уделить особое внимание подбору пар производителей с учетом результатов молекулярно-генетического анализа.

**Соответствие этическим стандартам.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.



**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках мероприятия 21ИБ «Разработать и внедрить технологию генетической идентификации растительноядных и лососевых видов рыб» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Научно-технологии и техника» на 2016-2020 годы, Республика Беларусь.

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI FOR SILVER (*HYPOPHthalmichthys MOLITRIX VAL.*) AND BIGHEAD (*HYPOPHthalmichthys NOBILIS RICH.*) CARPS GROWN IN AQUACULTURE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

A.Yu. Nosova, V.N. Kipen, N.I. Tsar, V.A. Lemesh

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

E-mail: a.nosova@igc.by, v.kipen@igc.by, a.tsar@igc.by, v.lemesh@igc.by

In this study we evaluated the genetic diversity of silver (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) and bighead (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) carps grown in aquaculture in the territory of the Republic of Belarus. Genotyping was obtained for 11 STR-loci – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo 34, Hmo36, Hmo37, Hmo40. The following parameters were calculated: the average number of alleles per locus, the effective number of alleles, the levels of expected and observed heterozygosity, the value of the Shannon information index and the fixation indexes  $F_{IS}$ . The obtained results indicate moderate (for silver carp) and sufficiently high (for bighead carp) genetic diversity of the studied samples of carps, up to the possibility to allocate several groups for subsequent work on obtaining linear material and further reproduction, including commercial fish. However, to achieve these goals, it is necessary to pay special attention to the selection of pairs of producers, taking into account the results of molecular genetic analysis. Evaluation of the genetic diversity of these species of herbivorous fish, bred in the Republic of Belarus, in comparison with the results of other researchers indicate a significant genetic resource of domestic producers.

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ БІЛОГО (*HYPOPHthalmichthys MOLITRIX VAL.*) І СТРОКАТОГО (*HYPOPHthalmichthys NOBILIS RICH.*) ТОВСТОЛОБИКІВ, ВИРОЩУВАНИХ В АКВАКУЛЬТУРІ В РЕСПУБЛІЦІ БІЛОРУСЬ, НА ОСНОВІ ПОЛІМОРФІЗМУ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ

А.Ю. Носова, В.Н. Кипень, А.И. Царь, В.А. Лемеш

У роботі дано оцінку генетичного різноманіття білого (*Hypophthalmichthys molitrix Val.*) і строкатого (*Hypophthalmichthys nobilis Rich.*) товстолобиків, що розводять на території Республіки Білорусь, за даними генотипування 11 STR-локусів – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo 34, Hmo36, Hmo37, Hmo40. Розраховані наступні показники: середнє число алелей на локус, ефективне число алелей, рівні очікуваної і наявної гетерозиготності, значення інформаційного індексу Шеннона і індекс фіксації  $F_{IS}$ . Одержані результати свідчать про помірне (для строкатого товстолобика) і достатньо високе (для білого товстолобика) генетичне різноманіття вивчених груп, що дозволяє збільшити кількість груп для подальшої роботи з отримання лінійного матеріалу і подальшого відтворення. Для досягнення даних цілей слід приділяти особливу увагу підбору батьківських пар з урахуванням результатів молекулярно-генетичного аналізу. Оцінка генетичного різноманіття цих видів рослиноїдних риб, які розмножується в Республіці Білорусь, в порівнянні з результатами інших досліджень свідчить про значну кількість генетичних ресурсів вітчизняних виробників.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Contributing to food security and nutrition for all : The state of world fisheries and aquaculture, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, 190 p.
2. Li, S.F., Xu, J.W., Yang, Q.L., Wang, C.H., Chen, Q., Chapman, D.C., and Lu, G., A comparison of complete mitochondrial genomes of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis*: implications for their taxonomic relationship and phylogeny, *J. Fish Biol.*, 2009, vol. 74, no. 8, pp. 1787–803. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02258.x
3. Gheyas, A.A., Woolliam, J.A., Taggart, J.B., Sattar, M.A., Das, T.K., McAndrew, B.J., and Penman D.J., Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment, *Aquaculture*, 2009, vol. 294, no. 3–4, pp. 187–93. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.013/
4. Wang, J., Yang, G., and Zhou, G., Quantitative trait loci for morphometric body measurements of the hybrids of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*H. nobilis*), *Acta Biologica Hungarica*, 2013, vol. 64, no. 2, pp. 169–83. doi: 10.1556/ABiol.64.2013.2.4.
5. Zhu, C., Tong, J., Yu, X., Guo, W., Wang, X., Liu, H., Feng, X., Sun, Y., Liu, L., and Fu, B., A

- second-generation genetic linkage map for bighead carp (*Aristichthys nobilis*) based on microsatellite markers, *Anim. Genet.*, 2014, vol. 45, no. 5, pp. 699–708. doi: 10.1111/age.12194.
6. Vlasov, V.A., Maslova, N.I., and Pavlov, A.D., Sohranenie i vosstanovlenie genofonda ryb akvakul'tury Rossii, *Izvestiya Timiryazevskoj sel'skohozyajstvennoj akademii*, 2012, vol. 5, pp. 83–92.
  7. Chen, Q., Wang, C., Lu, G., Zhao, J., Chapman, D.C., Zsigmond, J., and Li, S., Microsatellite genetic diversity and differentiation of native and introduced grass carp populations in three continents, *Genetica*, 2012, vol. 140, no. 4–6, pp. 115–23. doi: 10.1007/s10709-012-9663-8.
  8. Fedorova, N.N., Zalepuhin, V.V., Nekotorye diagnosticheskie aspekty koncepcii ehndogennoj raznokachestvennosti, *Vestn. Astrahan. Gosudarst. Tekhnich. Un-ta*, 2007, vol. 3, pp.51–4.
  9. Mia, M.Y., Taggart, J.B., Gilmour, A.E., Gheyas, A.A., Das, T.K., Kohinoor, A.H.M., Rahman, M.A., Sattar, M.A., Hussaina, M.G., Mazid, M.A., Penman, D.J., and McAndrew, B.J., Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci, *Aquaculture*, 2005, vol. 247, no. 1–4, pp. 267–73. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.018.
  10. Gheyas, A.A., Cairney, M., Gilmour, A.E., and Sattar, M.A., Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species, *Mol. Ecol. Not.*, 2006, vol. 6, no. 3, pp. 656–9. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01288.x.
  11. Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
  12. Peakall, R., Smouse, P.E., GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update, *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 19, pp. 2537–9. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
  13. Feng, X., Yu, X., Fu, B., He, S., and Tong, J., Development of 159 transcript-associated microsatellite markers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Conserv. Genet. Res.*, 2014, vol. 6, no. 1, pp. 111–3. doi: 10.1007/s12686-013-0017-3.
  14. Wang, C.Z., Liang, H.W., Zou, G.W., Luo, X.Z., Li, Z., Tian, H., and Hu, G.F., Genetic variation analysis of two silver carp populations in the middle and upper Yangtze River by microsatellite, *Yi Chuan*, 2008, vol. 30, no. 10, pp. 1341–8. doi: 10.3724/SP.J.1005.2008.01341.
  15. Liao, M., Yang, G., Wang, X., Wang, D., Zou, G., and Wei, Q., Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*), *Mol. Ecol. Not.*, vol. 7, no. 1, pp. 95–9. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01542.x.
  16. Guo, W., Xiaomu Yu, X., and Tong, J., Development of 134 novel polynucleotide-repeat microsatellite markers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Conserv. Genet. Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 525–8. doi: 10.1007/s12686-012-9843-y.
  17. Cheng, L., Liu, L., Yu, X., and Tong, J., Sixteen polymorphic microsatellites in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and cross-amplification in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Mol. Ecol. Res.*, 2008, vol. 8, no., 3, pp. 656–8. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.02037.x.
  18. Stepien, C.A., Elz, A.E., and Snyder, M.R., Invasion genetics of the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) across North America: Differentiation of fronts, introgression, and eDNA detection, *BioRxiv*, 2018, (in print). doi: <https://doi.org/10.1101/392704>.
  19. Nazish, N., Abbas, K., Abdullah, S., and Zia M.A., Microsatellite Diversity and Population Structure of *Hypophthalmichthys molitrix* in Hatchery Populations of Punjab, *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 2018, vol. 18, pp. 1113–22. doi: 10.4194/1303-2712-v18\_9\_10.

Поступила в редакцию 24.01.19  
После доработки 25.02.19  
Принята в печать 18.11.19