

БЄЛІКОВА О. Ю.^{1✉}, ЗАЛОЇЛО О. В.¹, ТАРАСЮК С. І.¹, МРУК А. І.¹, РОМАНЕНКО В. М.²¹ Інститут рибного господарства НААН України,
Україна, 03164, м. Київ-164, вул. Обухівська, 135² Національний університет харчових технологій,
Україна, 01601, м. Київ-33, вул. Володимирська, 68✉ belikova.e.y@gmail.com, (050) 772-77-47, (098) 526-56-55ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)
ЧЕРНІВЕЦЬКОГО ЛОКАЛЬНОГО СТАДА ЗА SSR-МАРКЕРАМИ

Мета. В Україні спостерігається тенденція до розвитку високотехнологічних форелевих господарств. Для ведення селекційної роботи необхідним є аналіз генетичної структури райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) за молекулярно-генетичними методами. Метою роботи було дослідження генетичної структури за мікросателітними локусами *O. mykiss* чернівецького локального стада. **Методи.** Визначення генетичної структури проводили за показниками: ефективною кількістю алелей на локус (n_e), фактичною (H_o) та очікуваною (H_e) гетерозиготністю, індексами фіксації (F_{is}) та поліморфізму (PIC). **Результати.** Виявлено специфічні особливості структури генофонду локального стада *O. mykiss* за SSR-локусами OMM 1032, 1077, 1088, STR 15, 60, 73. Середнє значення n_e становить 3,87. Зафіксовано високі середні показники H_e та F_{is} (0,73 та -0,14 відповідно). Для цих ДНК-маркерів характерний високий індекс поліморфізму (0,69). Обґрунтовано можливість проведення аналізу генетичної структури лососевих із використанням SSR-маркерів. **Висновки.** Виконано аналіз генетичної структури форелі *O. mykiss* за мікросателітними локусами. Показано, що локальне стадо характеризується високим рівнем гетерозиготності. Проведені дослідження свідчать про ефективність використання обраних локусів для індивідуальної ідентифікації та популяційно-генетичного аналізу.

Ключові слова: *Oncorhynchus mykiss*, SSR-маркери, гетерозиготність, поліморфізм.

В Україні спостерігається активне відновлення форелівництва після тривалого занепаду цієї ланки рибництва, що спостерігався в 90-х роках ХХ ст. [1], за рахунок створення високотехнологічних індустріальних господарств із замкнутим водопостачанням. Індустріальне форелівництво характеризується інтенсивністю

виробництва та високою рентабельністю завдяки значному виходу продукції на одиницю площі [2]. Тому всебічні дослідження лососевих риб загалом та, зокрема, райдужної форелі є актуальною проблемою сучасного рибництва.

Райдужна форель *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), належить до роду тихоокеанських лососів, характеризується високою харчовою цінністю та має привабливі рибницько-біологічні властивості (високий темп росту, адаптивна пластичність, відтворювальні характеристики) [1, 3]. Основну частину вирощування лососевих у холодноводній індустріальній аквакультури України займає райдужна форель. Для ефективної селекції необхідним є вивчення структурно-функціональної організації геному риб. Використання молекулярно-генетичних методів із класичними селекційними прийомами дозволяє створювати стада плідників із бажаними господарсько-цінними показниками [4, 5]. Селективний відбір без знання генетичної структури може призвести до зменшення генетичного різноманіття через втрату алелей і зменшення частки гетерозигот у популяції. Саме рівень гетерозиготності є одним із важливих критеріїв для оцінки генетичної мінливості популяції. Дані, отримані під час використання молекулярно-генетичних методів, дозволяють підтримувати генетичне різноманіття для уникнення інбриднгу популяцій.

Мікросателітні локуси SSR (Simple Sequence Repeats) є зручним інструментом для популяційно-генетичних досліджень та вирішення різних практичних селекційно-генетичних завдань [5]. Використання SSR-маркерів, яким притаманний високий рівень мінливості та кодомінантний характер спадковості [4, 6], дозволяє охарактеризувати популяційну структуру у повній мірі. Таким чином, мікросателітні маркери зручно використовувати

© БЄЛІКОВА О. Ю., ЗАЛОЇЛО О. В., ТАРАСЮК С. І., МРУК А. І., РОМАНЕНКО В. М.

для контролю та управління запасами цінних видів риб, зокрема оцінки популяції райдужної форелі [7–9] та інших видів лососевих [10, 11], для ідентифікації, паспортизації та підтвердження походження популяцій.

Із метою вивчення особливостей генетичної структури, рівня внутрішньопопуляційної генетичної мінливості локального стада райдужної форелі *O. mykiss* нами проведені дослідження з використанням мікросателітних маркерів ДНК.

Матеріали і методи

Як об'єкт для дослідження генетичної структури за SSR-маркерами було обрано райдужну форель (*O. mykiss*) чернівецького локального стада (сmt. Берегомет, Чернівецька обл.). Біологічні зразки відбирали в групі триліток (3+) (n=21). ДНК виділяли з плавців із використанням набору DNA-Go (BioLabTech LTD) та зберігали за t° –20°C.

Дослідження поліморфізму проводили за шістьма мікросателітними маркерами: OMM1032, OMM1077, OMM1088, STR 15, STR60, STR73. SSR-праймери OMM1032, 1077, 1088 [7] були розроблені на основі ДНК *O. mykiss* (штам Kamloop). Також було використано праймери (STR 15, 60, 73) [10], створені з послі-

довності ДНК струмкової форелі *Salmo trutta*. Характеристика праймерів наведена в таблиці 1.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) була проведена в ампліфікаторі «Thermo scientific» thermocycler (Arktik Termal Cycler) з використанням набору ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) за таких умов: один цикл початкової денатурації ДНК тривав за 94°C 5–10 хв (залежно від протоколу для кожного типу праймеру); наступні 30–35 циклів: денатурація ДНК за 94 °C – 30 сек, відпал праймерів за 58 °C – 30 сек, синтез ланцюга за 72°C – 30 сек; фінальна елонгація проходила за 72°C 5–10 хв.

Фракціонування ампліконів здійснювали в 3 % агарозному гелі з бромистим етидієм у 1ЧТАЕ буфері. Фореграми документували в УФ-світлі. Як маркер довжини фрагментів було обрано pUC DNA/Mspl(Hpall) Marker, 23 «Thermo scientific».

Довжини алелей визначали за допомогою програми *Totallab v.2.01*. Частоту кожної алелі на локус (P) та фактичну гетерозиготність (H_o) розраховували в програмі *GelStat*. Ефективне число алелей на локус (n_e), очікувану гетерозиготність (H_e), індекс фіксації та індекс поліморфізму PIC (polymorphism information content) обчислювали за загальновідомими методиками [12–14].

Таблиця 1. Характеристика мікросателітних праймерів, обраних для дослідження

	Локус	Повтор	Послідовність маркера (5'→3')	AT*	Походження праймерів
1	OMM 1032	(AG) ₂₂	F**: GCGAGGAAGAGAAAGTAGTAG R***: CCCATCTTCTCTCTGATTATG	58	<i>O. mykiss</i> [7]
2	OMM 1077	(GATA) ₉	F:GGCTGACCAGAGAAAGACTAGTT C R:TGTTACGGTGTCTGACATGC		
3	OMM 1088	(GATA) ₁₂	F:CTACAGGCCAACACTACAATC R:CTATAAAGGGAATAGGCACCT		
4	STR 15	(GT) ₁₃	F:TGCAGGCAGACGGATCAGGC R:AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC		<i>S. trutta</i> [10]
5	STR 60	(CT) ₁₃ ACCA(CT) ₃	F:CGGTGTGCTTGTGTCAGGTTTC R:GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC		
6	STR 73	(GT) ₁₃ TTATCT(GT) ₃	F:CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA R:STATTCTGCTTGTAAGTACAGCCTA		

Примітки: * AT – температура відпалу (Annealing temperature); F** – послідовність прямого праймеру (Forward primer); R*** – послідовність зворотного праймеру (Reverse primer).

Результати та обговорення

Мікросателітні локуси в більшості випадків характеризуються видовим консерватизмом, однак існує ряд маркерів, специфічних для кількох близькоспорідних видів. Такі маркери незамінні під час оцінювання генофонду. Вони характеризуються високою варіабельністю, кодомінантним характером успадкування, високим ступенем поліморфізму, відомою локалізацією в геномі. Це дозволяє використовувати їх для внутрішньовидової та міжпородної диференціації, вивчення генетичної різноманітності [4–6].

Розраховано показники, що характеризують генетичний поліморфізм райдужної форелі *O. mykiss* за обраними SSR-локусами (табл. 2). У результаті аналізу поліморфності за мікросателітними локусами виявлено 28 алельних варіантів. Отримані результати показали, що маркери мають високий ступінь поліморфізму.

Середня кількість алелей на локус складала 4,67. Найбільша кількість алелей та найвище значення ефективної кількості алелей на локус спостерігалися за маркером OMM1077 і становили 6 та 4,90 відповідно. Найменш поліморфним за кількістю алелей на локус виявився локус OMM1032. За досліджуваними шістьма локусами ефективна кількість алелей на локус коливалася від 2,91 до 4,90. Отже, за кількістю ефективних алелей на локус усі досліджувані маркери є високополіморфними.

Проведено розрахунки гетерозиготності за обраними локусами. Найменше значення фактичної гетерозиготності (H_e) спостерігається за локусом OMM 1088 та становить 0,8829, а найвища гетерозиготність 0,7951 зафіксована за локусом OMM 1077. Середнє значення фактичної гетерозиготності становить 0,835.

Найвища очікувана гетерозиготність спостерігалася за локусом OMM 1032 і становила

0,6563; найменше значення H_e за локусом OMM 1077 – 0,796. Середнє значення очікуваної гетерозиготності за шістьма локусами дорівнювало 0,7332. Високе значення середньої гетерозиготності свідчить про високий рівень генетичної мінливості. Фактичне збільшення рівня гетерозиготності за досліджуваними локусами може бути пов'язане з відбором особин за конкретними продуктивними якостями, але це припущення потребує проведення більш широких досліджень.

Проаналізовані SSR-маркери є інформативними для аналізу генетичної структури райдужної форелі, оскільки молекулярні маркери вважаються корисними для досліджень генетичного поліморфізму у випадках, коли середнє значення гетерозиготності знаходиться в діапазоні 0,3–0,8 [15].

За всіма локусами, крім OMM 1077, очікувана гетерозиготність більша за фактичну (рис.), отже, в цьому локальному стаді відсутнє явище інбридингу.

За показниками гетерозиготності для кожного локусу було розраховано індекс фіксації F_{IS} (коефіцієнт інбридингу), за яким можна виявити та оцінити переважання гетерозигот у популяції. За п'ятьма мікросателітними локусами спостерігалася переважання гетерозигот (рис.), оскільки коефіцієнт інбридингу коливався в межах $-0,13 \dots -0,2165$. Середній індекс фіксації становить $F_{IS} -0,1389$, що також свідчить про переважання гетерозигот над гомозиготами в дослідженій популяції. У цьому випадку $F_{IS} < 0$, отже, для популяції характерний аутбридинг. Можна зробити висновок, що селекційна робота у господарстві знаходиться на високому рівні, а досліджені плідники можуть бути використані у подальшій селекційній роботі.

Таблиця 2. Показники генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами

SSR локус	Розмір ампліконів, (п.о.)	n_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}	PIC
OMM1032	229-262	4	2,91	0,7984	0,6563	-0,2165	0,6050
OMM1077	252-296	6	4,90	0,7951	0,796	+0,0011	0,7656
OMM1088	113-147	5	4,57	0,8829	0,7813	-0,1300	0,7456
STR 15	258-319	4	3,26	0,8272	0,6936	-0,1926	0,6413
STR 60	133-150	5	4,00	0,8616	0,7501	-0,1486	0,7119
STR 73	128-148	4	3,60	0,8475	0,7222	-0,1730	0,6713
Середнє		4,67	3,87	0,835	0,7332	-0,1389	0,6901

Примітка. * n_a – кількість алелей на локус.

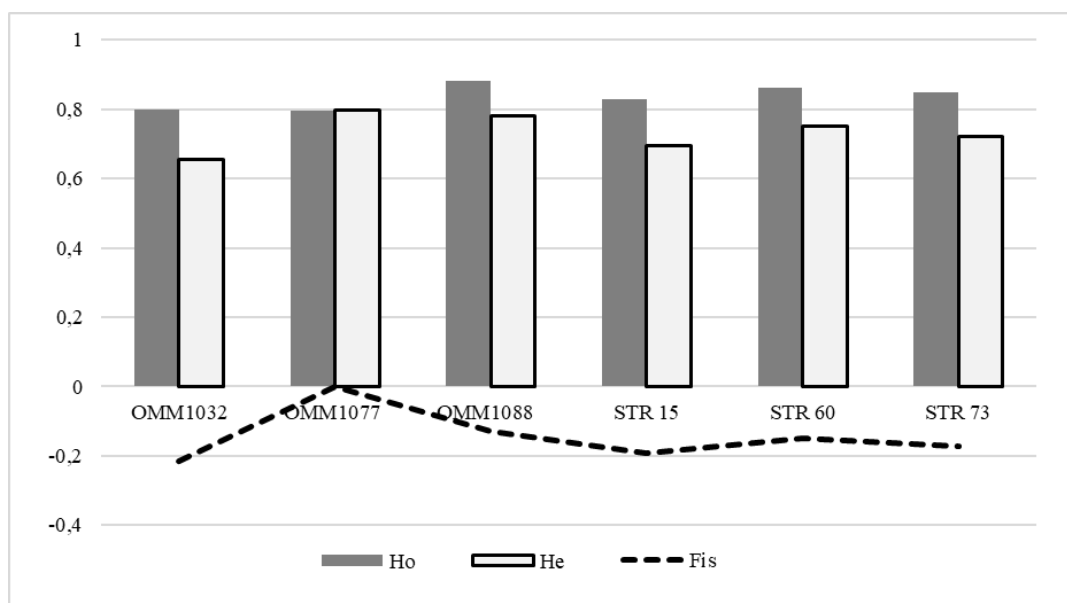


Рис. Індекс фіксації, фактична та очікувана гетерозиготність у локальному стаді райдужної форелі.

Для оцінки здатності мікросателітних маркерів фіксувати поліморфізм всередині популяції [14] було розраховано індекс інформаційного поліморфізму PIC (табл. 1). Значення цього показника коливалися від 0,61 за маркером OMM 1032 до 0,77 за маркером OMM 1077. Для кододомінантних ДНК-маркерів [16], до яких відносяться мікросателіти, значення індексу поліморфізму, більше від 0,5, свідчить про те, що маркер є високоінформативним для аналізу окресленого виду. Усі шість досліджених мікросателітних маркерів є високоінформативними, оскільки середнє значення PIC становить 0,69. Отже, обрані нами SSR-маркери придатні для аналізу генетичної структури популяцій райдужної форелі. За показником PIC можна зробити висновок, що найбільша розрізняльна потужність характерна для маркерів OMM 1077 та 1088.

Відомо, що за локусом OMM 1088 спостерігався високий індекс поліморфізму PIC (0,79–0,86) під час досліджень маточних стад райдужної форелі [9]. Маркер OMM 1088 [8, 9] використовується в складі мультиплексних комплексів для SSR-аналізу мінливості мікросателітних локусів. Такі комплекси дозволять в одностадійному методі підвищити ефективність досліджень та зменшити витрати на проведення аналізу, що буде сприяти виконанню масштабних програм селекції райдужної форелі.

У наведених дослідженнях маркери STR 15, 60, 73 також мали високі значення PIC, що коливалися в діапазоні 0,64–0,71. Ці три прай-

мери групи STR, які первинно були призначені для аналізу саме струмкової форелі [10], демонстрували високу інформативність і в дослідженнях генетичної структури популяцій райдужної форелі та атлантичного лосося [10, 11], які відносять до родини лососевих. Автори проведених дослідженням підтвердили, що збереження фланкуючих областей мікросателітних локусів серед близькоспоріднених видів дозволяє проводити міжвидове порівняння.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що всі використані групи маркерів є придатними для генетичної паспортизації популяцій райдужної форелі. Досліджені праймери мають однакову температуру відпалу (табл. 1), що дозволяє проводити одночасну ампліфікацію, а це значно скоротить час аналізу проб для потокової ідентифікації особин у популяції.

Висновки

Із використанням мікросателітних локусів одержано інформацію про генетичну структуру райдужної форелі *O. mykiss* чернівецького локального стада на геномному рівні. Виявлено високий рівень поліморфізму за мікросателітними локусами OMM 1032, 1077, 1088, STR 15, 60, 73. Проведені дослідження свідчать про ефективність використання обраних локусів для індивідуальної ідентифікації та популяційно-генетичного аналізу.

Усі досліджувані локуси виявилися поліморфними і налічували 28 алелей. За показниками генетичної мінливості (середні H_e та F_{is}

становлять 0,7332 та $-0,1389$ відповідно) відзначено високий рівень гетерозиготності. Середнє значення індексу фіксації ($-0,1389$) свідчить про відсутній інбридинг у досліджуваному локальному стаді райдужної форелі. Виявлено, що шість досліджених ДНК-маркерів мали високий індекс поліморфізму (середнє значення PIC становить 0,69) за дослідженими локусами і тому можуть бути корисними для моніторингу популяцій лососевих.

Одержана інформація за відповідної її оцінки та використання разом із класичними методами селекційно-плеїмінної роботи дає можливість оцінки генетичної мінливості райдужної форелі в штучних популяціях безпосередньо за ДНК-маркерами, а також створення груп плідників із бажаними господарсько-цінними характеристиками шляхом цілеспрямованого генетичного добору.

References

1. Bozhyk V.I., Bachuk Y.O. Current state and prospects of trout farm development in western Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj*. 2014. Vol. 16, № 3 (60), part. 3. P. 26–31. [in Ukrainian] / Божик В.Й., Бачук Є.О. Сучасний стан і перспективи розвитку форелівництва в західному регіоні України. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2014. Т. 16, № 3 (60), ч. 3. С. 26–31
2. Mendrisha P., Kurylenko G., Mruk A. Comparative characteristics of age-3–4 rainbow trout females reared in the conditions of the industrial fish farm «Sloboda-Banyliv». *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj*. 2017. Vol. 19, № 79. P. 117–121. [in Ukrainian] / Мендришора П.Д., Куріненко Г.А., Мрук А.І. Порівняльна характеристика 3–4 річних самиць райдужної форелі вирощених в умовах індустриального господарства «Слобода-Банілів». *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. Гжицького*. 2017. Т. 19, № 79. С. 117–121.
3. Aquaculture of artificial reservoirs. Industrial aquaculture: textbook / ed. A.I. Andriushchenko, N.I. Vovk. Kyiv: NUBiP, 2014. Part. II. 586 p. [in Ukrainian] / Аквакультура штучних водойм. Індустриальна аквакультура: підручник / за ред. А.І. Андрющенко, Н.І. Вовк. К.: НУБіП, 2014. Ч. II. 586 с.
4. O'Connell M., Wright J. M. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1997. Vol. 7 (3). P. 331–363. doi: 10.1023/A:1018443912945.
5. Tarasjuk S., Bielikova O., Kolisnyk S. Actuality of molecular genetic studies in aquaculture. *Problems of Environmental Biotechnology*. 2018. № 1. URL: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/12877/17714> (Last accessed: 23.02.2019). [in Ukrainian] / Тарасюк С.І., Белікова О.Ю., Колісник С.О. Актуальність молекулярно-генетичних досліджень в аквакультурі. *Problems of Environmental Biotechnology*. 2018. № 1. URL: <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/12877/17714> (дата звернення: 23.02.2019).
6. Moradi A., Keyvanshokoo S. Microsatellite DNA marker in aquatic organisms. *Scientific Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol. 2 (9). P. 184–189. doi: 10.14196/sjbs.v2i9.1001.
7. Rexroad III C.E., Coleman R.L., Hershberger W.K., Killefer J. Rapid communication: Thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout. *J. Anim. Sci.* 2002. Vol. 80, Is. 2. P. 541–542. doi: 10.2527/2002.802541x.
8. Glover K.A. Genetic characterisation of farmed rainbow trout in Norway: intra and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees. *BMC Genetics*. 2008. Vol. 9, Is. 87. doi: 10.1186/1471-2156-9-87. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/9/87> (Last accessed: 23.02.2019).
9. Johnson N.A., Rexroad C.E., Hallerman E.M., Vallejo R.L., Palti Y. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture*. 2007. Vol. 266. P. 53–62. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.054.
10. Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D., Guyomard R. (CT) and (GT) microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*. 1993. Vol. 71. P. 488–496.
11. Presa P., Guyomard R. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology*. 1996. Vol. 49 (6). P. 1326–1329. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb01800.x.
12. Zhivotovsky L.A. Population biometrics. Moscow: Nauka, 1991. 271 p. [in Russian] / Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
13. Kuznetsov V.M. Wright's F-statistics: estimation and interpretation. *Problems of Productive Animal Biology*. 2014. Vol. 4. P. 80–104. [in Russian] / Кузнецов В.М. F-статистики Райта: оценка и интерпретация. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2014. № 4. С. 80–104.
14. Nagy S., Poczai P., Cernák I., Gorji A.M., Hegedűs G., Teller J. PICcalc: An Online Program to Calculate Polymorphic Information Content for Molecular Genetic Studies. *Biochem Genet.* 2012. Vol. 50, № 9–10. P. 670–672. doi: 10.1007/s10528-012-9509-1.
15. Takezaki N., Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 1996. Vol. 144. P. 389–399.
16. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980. Vol. 32. P. 314–331.

BIELIKOVA O.¹, ZALOILO O.¹, TARASJUK S.¹, MRUK A.¹, ROMANENKO V.²

¹ Institute of Fisheries NAAS of Ukraine,
Ukraine, 03164, Kyiv-164, Obukhivska str., 135

² The National University of Food Technologies,
Ukraine, 01601, Kyiv-33, Volodymyrska str., 68

GENETIC STRUCTURE OF THE CHERNIVTSI LOCAL STOCK OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) AS DETERMINED BY SSR-MARKERS

Aim. The trend towards the development of high-tech trout farms is observed in Ukraine. The analysis of the genetic structure of rainbow trout by molecular genetic methods is necessary for breeding work. Therefore, the purpose of the study was to study polymorphism at the microsatellite loci of *Oncorhynchus mykiss* of the chernivetsk local herd. **Methods.** The determination of the genetic polymorphism was carried out according to indicators: the effective number of alleles on the locus (n_e), the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, indexes of fixation (F_{is}) and polymorphism (PIC). **Results.** Specific features of the structure of the gene pool of the local herd *O. mykiss* by the SSR loci OMM 1032, 1077, 1088, STR 15, 60, 73 were revealed. The average value of the effective number of alleles per locus was 3.87. The high average values of the heterozygosity of the local herd and the index of fixation were fixed (mean values of H_e and F_{is} is: 0.73 and -0.14, respectively). A high index of polymorphism was recorded for all used DNA markers and was 0.69. The possibility to analyse the genetic structure of salmon using these SSR-markers was substantiated. **Conclusions.** An analysis of the genetic structure of trout (*O. mykiss*) was performed by using of 6 microsatellite. It was shown that the investigated local herd has a high level of heterozygosity. The conducted studies have shown the effectiveness of using selected loci for individual identification and population-genetic analysis.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, SSR-markers, heterozygotes, polymorphism.