

Федеральное агентство по рыболовству

**Государственный научный центр Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ»**

**Филиал по пресноводному рыбному хозяйству
ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)**

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры

Выпуск 95



Астрахань – 2024

УДК 639.3/6
ББК 47.2
С 23

С23 Сборник научных трудов. Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры. – Вып. 95. – Астрахань: Издатель: Сорокин Роман Васильевич, – 118 с.

Рецензент: С.Б. Купинский, к.б.н., доцент кафедры «Аквакультура и экология» Дмитровского рыбохозяйственного технологического института (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный технический университет»

Сборник научных трудов ВНИИПРХ включает статьи, посвященные исследованиям по всем основным направлениям научного обеспечения аквакультуры: технологии выращивания, ихтиопатологии, криобиологии, кормлению рыб и селекционно-племенной работе. Несколько статей посвящены вопросам мониторинга естественных водоемов рыбохозяйственного значения.

Собранные вместе, статьи сборника формируют представление о тематике исследований, выполняемых в настоящее время в Филиале по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»). Научные статьи представлены в авторской редакции.

УДК 639.3/6
ББК 47.2
С 23

ISBN 978-5-00201-216-9

© Филиал по пресноводному рыбному хозяйству ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»), 2024 г.

© Издатель: Сорокин Роман Васильевич, 2024

К ВОПРОСУ О МОНОКЛОНАЛЬНОСТИ СТАДА ДИПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ С КАРПОМ

Е.В. Иванёха, Л.Н. Дума, А.В. Рекубратский
Филиал по пресноводному рыбному хозяйству
ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)
E-mail:genetics@vniiprh.vniro.ru

Проведен анализ микросателлитных ДНК-маркеров у четырех гиногенетических поколений диплоидных гибридов серебряного карася и карпа. Показано, что у всех карасекарпов из разных поколений число аллелей и их длина в каждом из исследованных микросателлитных локусов были одинаковы. Таким образом, все особи в стаде диплоидных карасекарпов генетически тождественны между собой и составляют единый клон.

Ключевые слова: гибриды серебряного карася и карпа; диплоиды; селекция; индивидуальный отбор; клон; микросателлиты.

ВВЕДЕНИЕ

Карасекарпы первого поколения (F1) получены во ВНИИПРХе в 1975 г. от скрещивания самок двуполой формы серебряного карася *Carassius gibelio* Bloch Волминской популяции (Белоруссия) с самцами карпа *Cyprinus carpio* L. Самки карасекарпов продуцируют диплоидные нередуцированные яйцеклетки. Самцы F1 стерильны, поэтому воспроизводство гибридов осуществляется с помощью индуцированного гиногенеза [Черфас, Илясова, 1980]. К настоящему времени получено девятое поколение индуцированного гиногенеза и, соответственно, десятое последовательное поколение гибридов (F1 → G1 → G2 → G3 → G4 → G5 → G6 → G7 → G8 → G9).

От диплоидных самок карасекарпов, у которых с помощью селекции улучшены показатели репродуктивной способности, при скрещивании с самцами родительских видов могут быть получены возвратные триплоидные гибриды F_{бк} и F_{бск} для товарного выращивания и зарыбления естественных водоемов. Преимущества трёх форм карасекарпов по сравнению с родительскими видами, основные направления их рыбохозяйственного использования и морфологические признаки гибридов обсуждались ранее [Рекубратский и др., 2012; Иванёха и др., 2023].

Основным методом селекции карасекарпов являлся массовый отбор диплоидных гибридных самок по относительной рабочей плодовитости. Напряженность отбора в каждом поколении составляла 15-20%.

При работе с самками четвертого поколения гиногенеза (G4) неожиданно оказалось, что в возвратном потомстве у значительной части самок наблюдается низкий выход личинок. Гибель эмбрионов была вызвана

анеуплоидией и возникновением большого количества хромосомных aberrаций. Выход из этого весьма нежелательного положения был найден в индивидуальном многократном отборе самок по комплексу признаков репродуктивной способности, который применялся наряду с массовым отбором, начиная с четвертого гиногенетического поколения. В число этих признаков входили следующие: размеры икры (число икринок в 1 г икры), процент оплодотворения, выход нормальных личинок в гиногенетическом и возвратном потомствах. Индивидуальный отбор в селекции карасекарпов оказался весьма эффективным, обеспечив уже у самок G5 высокий уровень выживаемости возвратных триплоидных эмбрионов (до 85 %).

При созревании гибридных ооцитов имеет место эндоредупликация хромосом, а затем два последовательных мейотических деления [Емельянова, 1984]. Такой характер созревания приводит к возникновению в индивидуальных потомствах гибридных самок клонов, что было доказано с помощью анализа по биохимическим маркерам и трансплантационного теста [Абраменко, 1988; Черфас и др., 1986; 1989]. Быстрая и эффективная селекция гибридных самок по признакам плодовитости, вероятно, связана с клональным характером наследования в индивидуальных гиногенетических потомствах. Фактически проводился отбор наиболее плодовитых клонов.

В результате стадо диплоидных гибридов может быть представлено небольшим числом клонов. В пользу этого предположения говорят данные морфологического анализа, который показал высокую степень внутригрупповой однородности карасекарпов.

Для исследования генетической структуры четырёх гиногенетических поколений диплоидных карасекарпов в качестве генетических маркеров были использованы микросателлитные локусы ДНК [Crooijmans et al., 1997; Kohlmann et al., 2003; Jewel et al., 2006; Li et al., 2007].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследуемым материалом являлись фрагменты плавников, взятые у диплоидных гибридов между серебряным карасём и карпом пятого, шестого, седьмого и восьмого гиногенетических поколений (G5, G6, G7, G8) и зафиксированные в 96-% этаноле.

Для выделения ДНК применяли солевую экстракцию. Полученные препараты ДНК использовали для анализа аллельного состава семи микросателлитных локусов поли (CA) типа – MFW1, MFW4, MFW7, MFW9, MFW16, MFW28 и MFW31 [Crooijmans et al., 1997].

ПЦР проводили на амплификаторах Mastercycler gradient и Mastercycler personal (Eppendorf, Germany). Для постановки амплификации применялся режим touchdown-ПЦР: предварительная денатурация ДНК 95°C – 5 мин; 11 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 63°C в первом цикле – 25 с и снижение в каждом последующем цикле температуры отжига на 1°C, синтез ДНК – 72°C – 30 с; 24 цикла: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 58°C – 25 сек, синтез ДНК – 72°C – 30 с; досинтез ДНК при 72°C – 10 мин.

Разделение продуктов специфической амплификации проводили посредством вертикального электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле в камере VE-20 с источником питания Эльф-8, $V = 250$ В, в течение 3,5-4,5 часов. После окончания электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 30 мин, затем промывали в дистиллированной воде 30 мин. Результаты электрофореза регистрировали в системе AutoChemі для изучения изображений, длину аллелей в парах нуклеотидов (пн) определяли с помощью программного обеспечения LabWork 4.5 (UVP, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех исследованных диплоидных карасекарпов поколения G8 число аллелей и их длина в каждом из семи микросателлитных локусов были одинаковы (рисунки 1-7А). То же самое можно утверждать об этих показателях у гибридов поколений G5 (рисунки 1-7), G6 и G7 (рисунок 7Б).

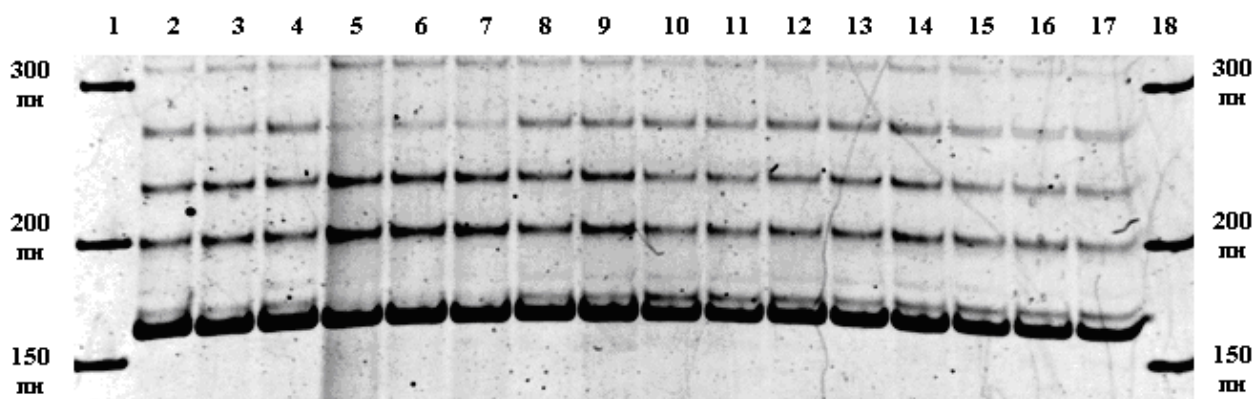


Рисунок 1 – Продукты амплификации локуса MFW1 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 10-300 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

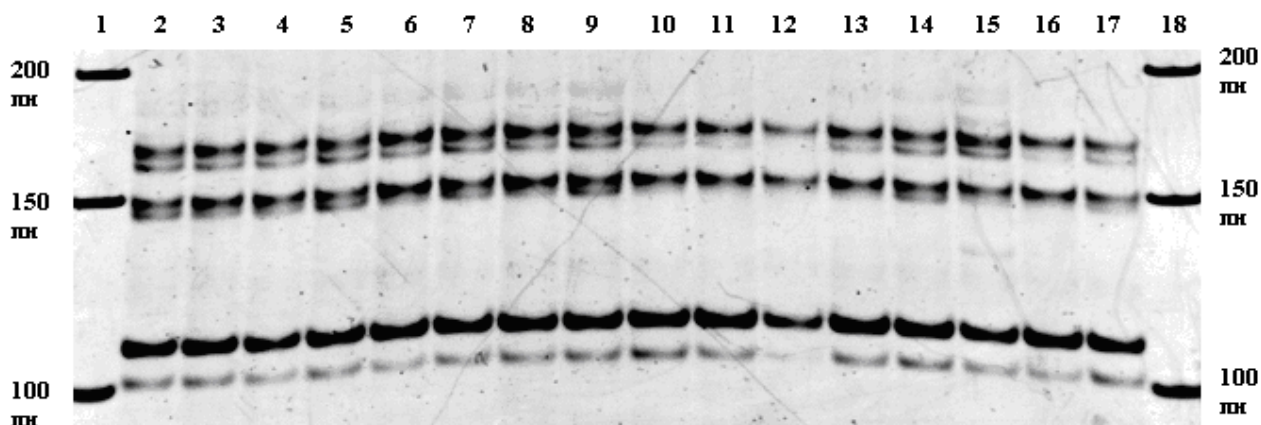


Рисунок 2 – Продукты амплификации локуса MFW4 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 10-300 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

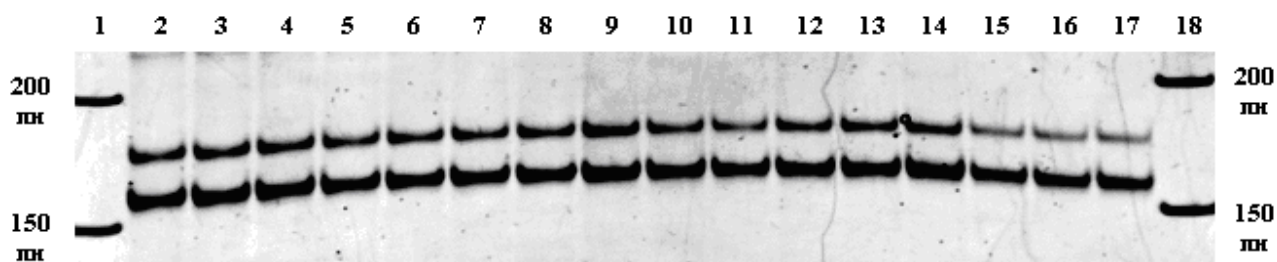


Рисунок 3 – Продукты амплификации локуса MFW7 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 25-700 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

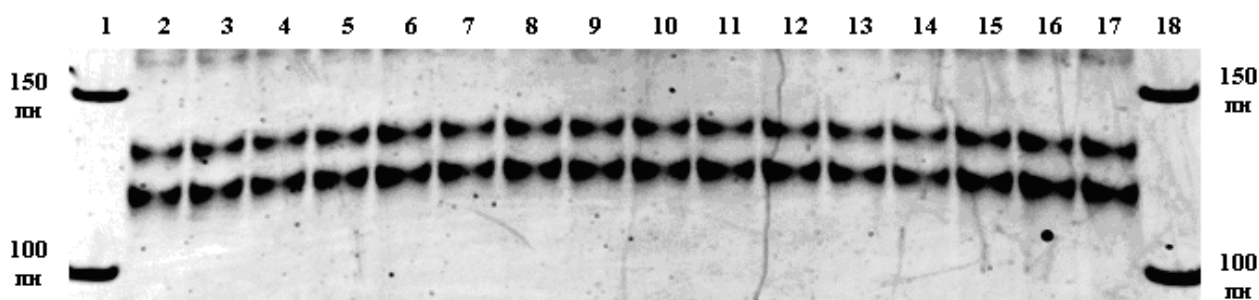


Рисунок 4 – Продукты амплификации локуса MFW9 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 10-300 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

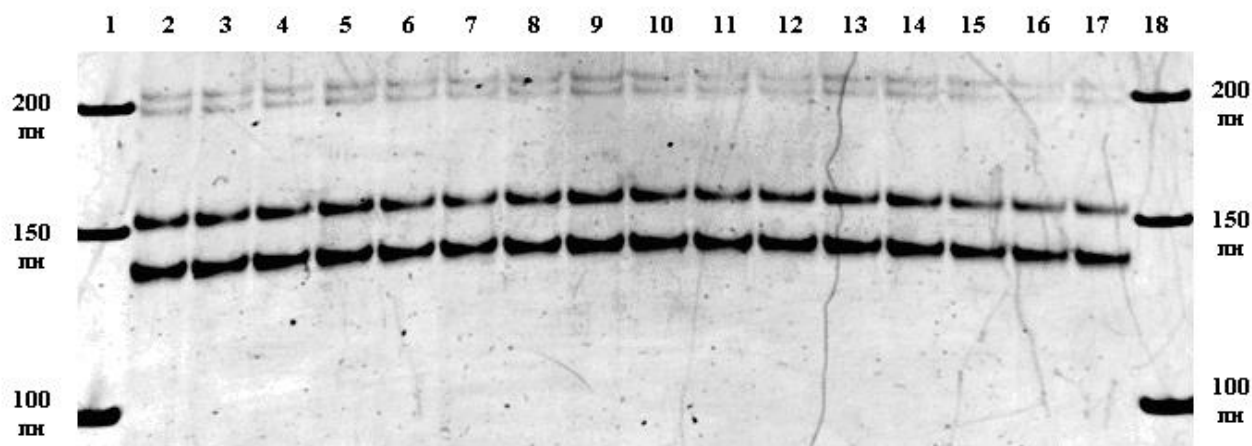


Рисунок 5 – Продукты амплификации локуса MFW16 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 25-700 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

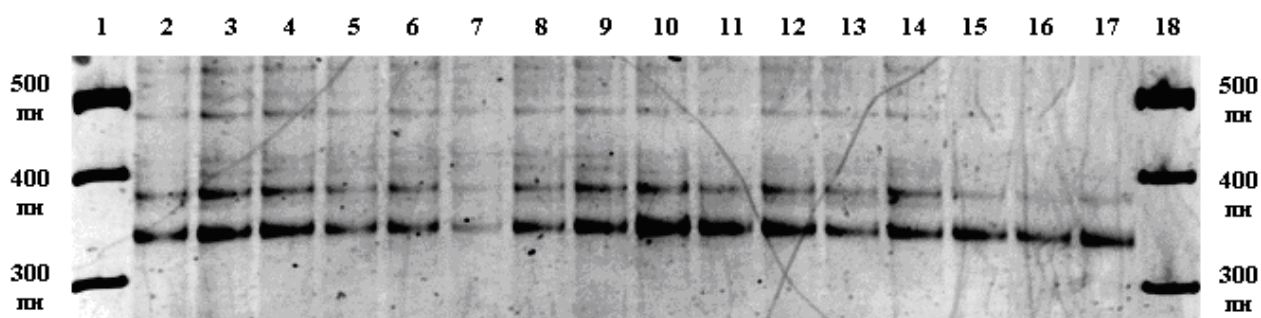
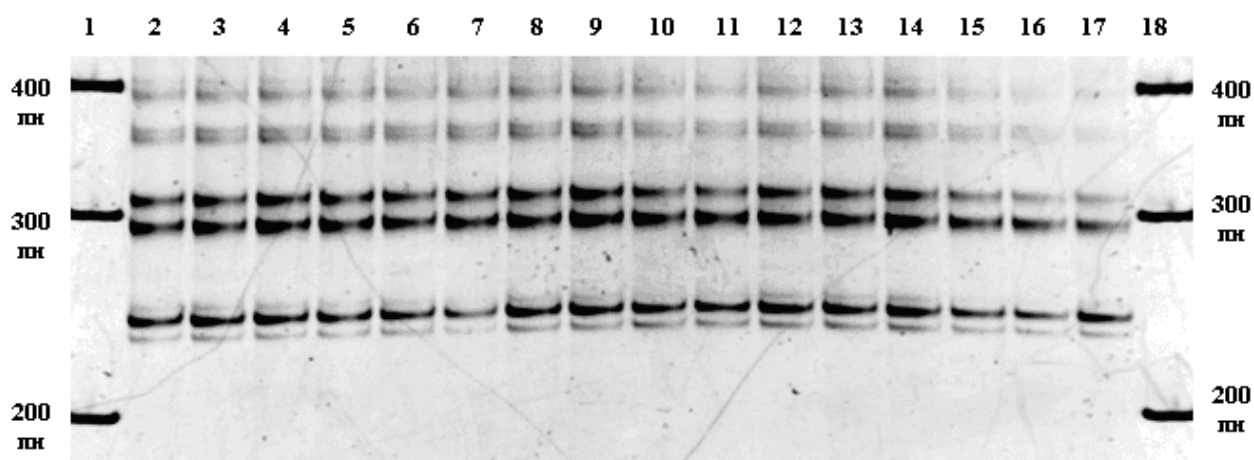
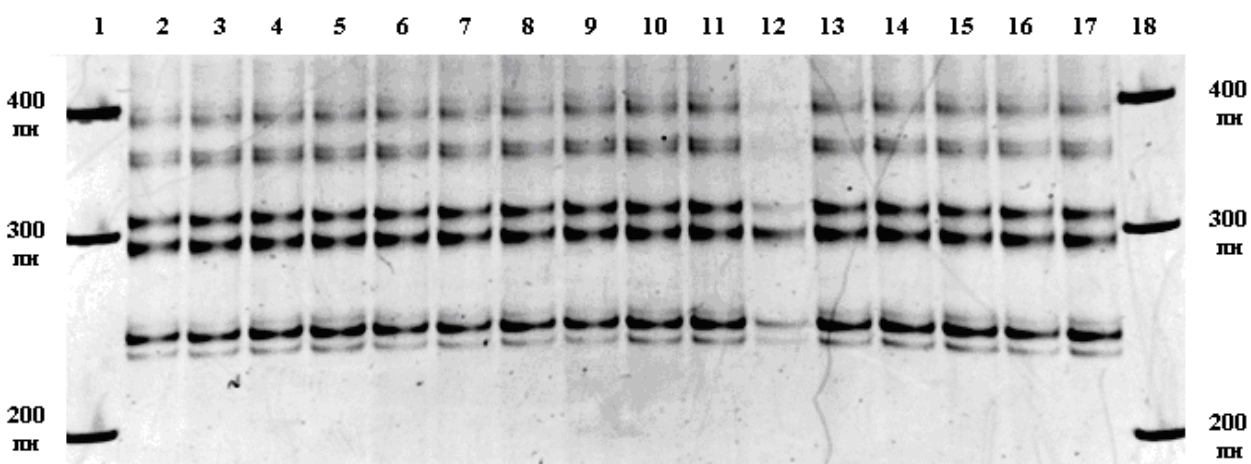


Рисунок 6 – Продукты амплификации локуса MFW28 у диплоидных карасекарпов. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 100-1000 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8



А



Б

Рисунок 7 – Продукты амплификации локуса MFW31 у диплоидных карасекарпов.

А. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 100-1000 пн; дорожки 2-9 – продукты ПЦР с ДНК G5, 10-17 – с ДНК G8

Б. Дорожки 1, 18 – маркер длин фрагментов ДНК 100-1000 пн; дорожки 2-7 – продукты ПЦР с ДНК G5, 8-11 – с ДНК G6, 12-17 – с ДНК G7

Таким образом, число и длина аллелей для каждого из локусов были одинаковы у диплоидных гибридов четырёх последовательных поколений гиногенеза, с пятого по восьмое (рисунки 1-7). Идентичность полученных характеристик микросателлитных ДНК-маркеров у всех карасекарпов из выборок исследованных поколений позволяет сделать вывод, что уже с пятого поколения стадо диплоидных гибридов являлось генетически однородным и представляло собой один изогенный клон.

Как было показано ранее [Абраменко, 1988; Черфас и др., 1986; 1989], в индивидуальных гиногенетических потомствах самок диплоидных гибридов значительная часть особей (в исследованных поколениях G2 и G3 в среднем 79%) были генетически идентичными. Полная изогенность этих потомств может нарушаться присутствием некоторого числа отличающихся от основного клона особей. Хотя каждое индивидуальное потомство в целом представляет собой клон, между отдельными потомствами отмечены генетические различия, определяющиеся различием генотипов самок F1 – основательниц исходного стада, т.е., стадо карасекарпов на начальных этапах воспроизводства являлось мультиклональным.

Селекция гиногенетических диплоидных гибридов по плодовитости и способности к индуцированному гиногенезу включала получение и отбор гибридных самок, продуцирующих полноценные, генетически однородные гаметы и дающих наиболее полноценные клоны. В итоге стадо карасекарпов начиная с пятого гиногенетического поколения стало моноклональным, повторяя генотип одной из лучших по плодовитости из участвовавших в индивидуальном отборе самок.

Возникшая моноклональность имеет положительную сторону, поскольку обеспечивает высокую однородность стада карасекарпов по репродуктивным признакам. Однако резкое изменение условий выращивания может привести к значительным негативным последствиям, поскольку адаптироваться к ним из-за отсутствия генетической изменчивости карасекарпы не смогут.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Абраменко М.И. Применение метода трансплантации тканей в селекционно-генетических исследованиях карповых рыб: автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. – Москва, 1988. – 25 с.

Емельянова О.В. Цитологическое исследование процессов созревания и оплодотворения у гибридов серебряного карася с карпом // Цитология. – 1984. – Т. 26. – С. 1427-1433.

Иванёха Е.В., Дума Л.Н., Рекубратский А.В. Сравнительная морфологическая характеристика диплоидных гибридов серебряного карася с карпом // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ «Актуальные вопросы пресноводной аквакультуры». – 2023. – Вып. 94. – С. 34-43.

Рекубратский А.В., Иванёха Е.В., Балашов Д.А., Дума Л.Н., Дума В.В., Рекубратский Н.В., Ковалев К.В. Триплоидные гибриды серебряного карася с

карпом - новый объект аквакультуры // Вопросы рыболовства. – Т. 13, № 3(51). – 2012. – С. 626-642.

Черфас Н.Б., Илясова В.А. Индуцированный гиногенез у гибридов серебряного карася с карпом // Генетика. – Т. 16, № 7. – 1980. – С. 1260-1269.

Черфас Н.Б., Абраменко М.И., Емельянова О.В., Ильина И.Д., Трувеллер К.А. Генетические особенности индуцированного гиногенеза у гибридов серебряного карася с карпом // Генетика. – Т. 22, № 1. – 1986. – С. 134-139.

Черфас Н.Б., Емельянова О.В., Рекубретский А.В., Гомельский Б.И., Абраменко М.И. Исследование гибридов серебряного карася с карпом (опыт применения генетических методов в работах с отдаленными гибридами) // Сб. «Генетика в аквакультуре». – Л., Наука, 1989. – С. 137-152.

Crooijmans R.P.M.A., Bierbooms V.A.F., Komen J., Van der Poel J.J., Groenen M.A.M. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Animal Genetics. – 1997. – 28. – P. 129-134.

Jewel M.A.S., Rahman M.M., Islam M.N. Study of Genetic Variation in Different Hatchery Populations of Common Carp (*Cyprinus carpio*) of Mymensingh District in Bangladesh using Microsatellite DNA Markers // Journal of Bio-Science. – 2006. – Vol. 14. – P. 113-120.

Kohlmann K., Gross R., Murakaeva A., Kersten P. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers // Aquat. Living Resour. – 2003. – Vol. 16. – P. 421-431.

Li D., Kang D., Yin Q., Sun X., Liang L. Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations // Journal of Genetics and Genomics. – 2007. – No. 34(11). – P. 984-993.

ABOUT MONOCLONALITY IN STOCK OF PRUSSIAN CARP X COMMON CARP DIPLOID HYBRIDS

E.V. Ivanekha, L.N. Duma, A.V. Recoubratsky

State Scientific Center of the Russian Federation, Branch for the Freshwater Fisheries of VNIRO (VNIIPRKh)

(“All-Russian Research Institute of Freshwater Fisheries”)

E-mail: genetics@vniiprh.vniro.ru

Abstract. Microsatellite DNA markers analysis at four gynogenetic generations of Prussian carp and common carp diploid hybrids has been performed. Findings indicate that the stock of diploid hybrids is isogenic clone.

Keywords: Prussian carp x common carp hybrids; diploids; individual selection; clone; microsatellites.