

УДК 557.17:597.422

РАЗНООБРАЗИЕ ПАЛИИ *SALVELINUS ALPINUS* ФСГЦР РОПША ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

А. А. Борисовская^{1,2}, О. В. Апаликова¹, В. М. Голод³, В. Ю. Паньков³

¹Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства
им. Л.С. Берга (ФГБНУ «ГосНИОРХ»), Санкт-Петербург 199053, Россия

²Санкт-Петербургский государственный аграрный университет (СпбГАУ),
Санкт-Петербург 196600, Россия

³Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства (ФСГРЦ), филиал ФГБУ «Главрыбвод»,
Ленинградская обл., Ломоносовский р-н, пос. Ропша 188514, Россия

E-mail: sashaborisovskaya@gmail.com

Аннотация. В настоящее время существенно возрастает уровень антропогенного воздействия на природные популяции жилой формы арктического гольца палии, что неизбежно приводит к сокращению численности этого ценного промыслового вида. Особую актуальность приобретает вопрос об искусственном воспроизводстве палии и введении ее в аквакультуру для поддержания численности при сохранении всего разнообразия генетических ресурсов природной популяции. Целью данной работы является поиск генетических маркеров, пригодных для оценки нынешнего состояния генетического разнообразия палии в условиях искусственного воспроизводства, а также для последующего контроля. Методом ПЦР-ПДРФ проведен сравнительный анализ изменчивости мтДНК стада палии, разводимой в Федеральном селекционно-генетическом центре рыбоводства (ФСГРЦ филиал ФГБУ «Главрыбвод», пос. Ропша, Ленинградская обл.), и молоди, полученной от рыб нативной популяции и от заводского стада сайменской популяции (Финляндия).

Ключевые слова: аквакультура, палия *Salvelinus alpinus*, мтДНК, ПЦР, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

VARIETY OF THE ARCTIC CHAR *SALVELINUS ALPINUS* IN FSGTS ROPSHA ACCORDING TO THE DATA FROM MTDNA ANALYSIS

A. A. Borisovskaya^{1,2}, O. V. Apalikova¹, V. M. Golod³, V. Yu. Pankov³

¹Berg State Research Institute on Lake and River Fisheries (FSBSI "GOSNIORH"),
Saint-Petersburg 199053, Russia

²Saint-Petersburg State Agrarian University (SpbSAU), Saint-Petersburg 196600, Russia

³Federal Breeding and Genetics Center for Fish Culture (FSGTS), Branch of the FSBI "Glavrybvod",
Leningrad Region, Lomonosov District, Ropsha village 188514, Russia

E-mail: sashaborisovskaya@gmail.com

Abstract. Recently the level of anthropogenic impact on natural populations of the living form of the arctic char is substantially increased, which inevitably leads to a decrease in the abundance of this valuable commercial species. Particularly topical is the issue of artificial reproduction of the palia and its introduction into aquaculture in order to maintain abundance while preserving the entire diversity of the genetic resources of the natural population. The purpose of this work is to search for genetic markers suitable for assessing the current state of the genetic diversity of the palia in conditions of artificial reproduction, as well as for subsequent monitoring. A comparative analysis of the variability of the mtDNA of the herd of palia cultivated at the Federal Breeding and Genetics Center for Fish Culture (FSGTS branch of the Glavrybvod FGBU, Ropsha village, Leningrad Region) was carried out by PCR-RFLP method, and juveniles obtained from fish of the native population and from the factory herd of the Saimaa population (Finland).

Keywords: aquaculture, palia, *Salvelinus alpinus*, mtDNA, PCR, restriction fragment length polymorphism

ВВЕДЕНИЕ

Палия, жилая форма арктического гольца, обитает в озерах Скандинавии и России. В последние годы природные популяции этого ценного вида повсеместно стремительно сокращаются из-за антропогенного воздействия. В связи с этим вопрос об искусственном воспроизводстве палии и введении ее в аквакультуру весьма актуален.

Гольцы могут с успехом культивироваться летом и, что особенно важно, зимой в садковых озерных холодноводных хозяйствах Северо-запада России. Благодаря круглогодичному рыбоводному циклу сокращаются удельные затраты на производство продукции. Вследствие исключительной приспособленности к экстремальным температурным условиям, некоторые экотипы гольцов могут стать привлекательными объектами марикультуры в Баренцевом и, особенно, в Белом море, где температура слишком низка для выращивания атлантического лосося. Использование в промышленной аквакультуре этого уникального вида открывает широкие перспективы для ее развития в малонаселенных и заброшенных районах Арктической зоны России. Биологические особенности гольцов позволяют успешно использовать их в товарном рыбоводстве. Поздние сроки созревания: 3+–4+ у самцов и 4+–5+ у самок дают возможность максимально использовать генетический потенциал только соматического роста для получения крупной товарной продукции в минимальные сроки (Никандров и др., 2018).

При работе селекционеров с арктическим гольцом необходимо учитывать направление использования создаваемого стада. Если заводское стадо используется с целью искусственного воспроизводства для поддержания численности природной популяции, основной задачей должно быть сохранение природного биоразнообразия. Когда целью является введение в товарную аквакультуру, создается порода, максимально приспособленная к определенным природно-климатическим и технологическим условиям разведения. Очевидно, что в обоих случаях рыбоводные мероприятия должны сопровождаться генетическим мониторингом, поскольку одним из факторов, ответственных за сокращение биоразнообразия является, как отмечает Ю.П. Алтухов, «нерациональная хозяйственная деятельность, игнорирующая генетическую подразделенность видов и структуру внутривидовой наследственной изменчивости» (Алтухов и др., 1997). Молекулярно-генетические методы дают возможность идентификации и последующего контроля генетического разнообразия стад и пород.

Целью данного исследования было сравнение изменчивости мтДНК стада палии, разводимой в Федеральном селекционно-генетическом центре рыбоводства (ФСГЦР филиал ФГБУ «Главрыбвод», пос. Ропша, Ленинградская обл.), и молоди, полученной от рыб нативной популяции и от заводского стада сайменской популяции (Финляндия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения генетического разнообразия внутри популяций палии были использованы участки митохондриальной ДНК, что объясняется ее уникальными особенностями: небольшим размером молекулы (Attardi, 1985), относительно высокой скоростью эволюции последовательностей митохондриальных генов по сравнению с ядерными локусами (Brown et al., 1979), гаплоидным материнским наследованием и отсутствием рекомбинаций (Birky, 2001).

Материалом для генетических исследований послужили образцы тканей личинок (хвостовой плавник и часть хвостового стебля) трех разных выборок палии *Salvelinus alpinus* (табл. 1).

Выделение и очистку суммарной ДНК проводили солевым методом (Aljanabi, Martinez, 1997).

Таблица 1

Материалы исследования

Наименование стада	Место сбора материала	Дата фиксации	Кол-во проб в выборке
Палия заводская	ФСГЦР, пос. Ропша	18.02.14	28
Палия заводская финская	Институт рыбного и охотничьего хозяйства, пос. Энонкоски (Финляндия)	15.05.14	30
Палия нативная	ФСГЦР, пос. Ропша	02.14	25

Участки мтДНК ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, кодирующие 3, 4, 5 и 6 субъединицы надоксиддегидрогеназы, а также CR — т. н. контрольный регион, были амплифицированы с использованием специфичных праймеров (табл. 2).

Таблица 2

Праймеры исследованных маркеров

Участок	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	T° _{отж.}	Ссылка на авторов
ND3/ND4L/ND4	AJG-1	5'-TTACGCGTATAAGTGACTTCCAA-3'	50 °C	Gharrett <i>et al.</i> , 2001
	AJG-2	5'-TTTTGGTTCCTAAGACCAATGGAT-3'		
ND5/ND6	AJG-11	5'-AACAGCTCATCCATGGTCTTAGG-3'	50 °C	Gharrett <i>et al.</i> , 2001
	AJG-16	5'-TTACAACGATGGTTTTTCATGTCA-3'		
CR	CR-f	5'-CCACTAGCTCCCAAAGCTA-3'	52 °C	Brzuzan, Ciesielski, 2002
	CR-r	5'-ACTTTCTAGGGTCCATC-3'		

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора BIO RAD My Cycler в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 единицу *Taq* ДНК-полимеразы, 2,5 мкл 10 × *Taq*-буфера (Сибэнзим), 1 mM каждого dNTP, 0,25 мкМ каждого праймера и около 50 нг геномной ДНК в конечном объеме 25 мкл при следующих условиях: предварительная денатурация при 94 °C (5 мин) с последующими 35 циклами, включающими денатурацию цепей при 94 °C (30 сек), отжиг праймеров при 52 °C (1 мин) для CR или при 50 °C (1 мин) для ND5/ND6 и ND3/ND4L/ND4 и элонгацию при 72 °C (2,4 мин) с заключительным циклом при 68 °C (4 мин).

Аликвоты ПЦР-фрагментов обрабатывали набором рестрикционных ферментов (табл. 3) в условиях, рекомендованных изготовителем (Сибэнзим, Россия).

Таблица 3

Рестрикционные ферменты, используемые в работе

№	Рестриктаза	Сайт рестрикции	ND5/ND6	ND3/ND4L/ND4	CR
1	<i>Alu</i> I	5'...AG↓CT...3' 3'...TC↑GA...5'	+	+	+
2	<i>Fri</i> O I	5'...GRG↓CY...3' 3'...C↑YCGRG...5'	-	+	-
3	<i>Dra</i> I	5'...TTT↓AAA...3' 3'...AAA↑TTT...5'	+	-	-
4	<i>Hinf</i> I	5'...G↓ANTC...3' 3'...CTNA↑.G..5'	+	-	+
5	<i>Hae</i> III	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'	+	+	-
6	<i>Msp</i> I	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	+	+	+
7	<i>Rsa</i> I	5'...GT↓AC...3' 3'...CA↑TG...5'	+	+	+
8	<i>Bme</i> 18 I	5'...G↓GWCC...3' 3'...CCWG↑G...5'	+	-	-

Примечания: R = A или G, W = A или T, Y = T или C, N = A или C или G или T.

Продукты рестрикции разделяли по стандартной методике (Sambrook *et al.*, 1989). Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве молекулярных маркеров длины использовали ДНК фага λ, гидролизованную рестриктазой *Pst* I, а также набор фрагментов ДНК, кратных 100 п. о. (Сибэнзим).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Икра ладожской палии для формирования исходного заводского стада была собрана в 2008 г. в районе о. Валаам. 30 тыс. икринок на стадии пигментации глаз были доставлены в ФСГЦР.

Сеголетки достигли средней массы тела 36 г. За три с половиной зимних месяца рыбы выросли более чем в два раза и достигли к началу апреля средней массы тела 90 г. При дальнейшем выращивании рыб их темп роста оставался высоким: за год выращивания масса тела двухгодовалых рыб возросла более чем в три раза. При этом вариабельность рыб по весу тела находилась на высоком уровне, что создавало предпосылки для их эффективного отбора по этому основному селекционному признаку в маточное стадо.

Самки исходного стада начали созревать в возрасте пяти лет. Их средняя масса тела оказалась 2,5 кг, а рабочая плодовитость — около 3,8 тыс. икринок. Самок использовали для получения потомства до восьмилетнего возраста. Их масса тела превышала 5 кг, а рабочая плодовитость — 5 тыс. икринок. В племенных скрещиваниях использовали не менее 50 самок и 50 самцов, которые относились к другой генерации и были на два года младше.

Молодь палии, использованная для генетических исследований, относилась к третьему поколению селекции.

Пробы «финской» палии были отобраны на рыбозаводе, принадлежащем финскому институту охоты и рыболовства, в Энонкоски. Донором данного заводского стада палии послужила популяция озера Сайма. Количество поколений аналогично ропшинскому стаду. Детали селекционно-племенной работы нам не известны, но стадо гораздо более однородное, о чем свидетельствует очень краткий нерестовый сезон: 1–2 недели, тогда как в ФСГЦР нерест продолжается не менее трех месяцев.

В 2014 г. осуществлялась заготовка половых продуктов в природной популяции в районе острова Воосинсаари. Всего было поймано и использовано в скрещиваниях 47 самок и 10 самцов. Процент осеменения был довольно низким, что обусловлено полевыми условиями сбора и начального этапа инкубации. Однако в дальнейшем выживаемость эмбрионов была высокой.

Для описанных выше выборок палии *Salvelinus alpinus* был проведен анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных участков мтДНК (ПЦР-ПДФ-анализ). Выбор метода обусловлен его широким применением в исследованиях родственных отношений и филогеографии у представителей лососевых рыб (Gharrett et al., 2001), в частности, гольцов рода *Salvelinus* (Олейник и др., 2003; 2005; Радченко, 2005).

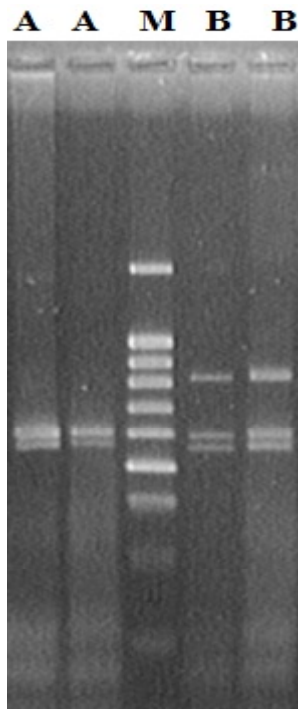
Размеры фрагментов, полученных в результате реакции рестрикции по каждому из участков (ND3/ND4L/ND4, ND5/ND6 и CR) мтДНК, представлены в табл. 4.

Анализ электрофоретических спектров продуктов рестрикции участков ND3/ND4L/ND4 и CR в исследованных трех выборках палии показал наличие только одного гаплотипа, что свидетельствует об отсутствии полиморфизма в этих участках митохондриального генома исследованных проб.

Иные результаты показал анализ ЭФ спектров, полученных при рестрикции участка ND5/ND6, кодирующего 5 и 6 субъединицы надоксиддегидрогеназы мтДНК. Так, при электрофоретическом разделении продуктов рестрикции ферментом *Hae* III этого участка мтДНК были визуализированы два различающихся спектра (табл. 4, рисунок), соответствующие гаплотипам А и В.

Среди исследованных выборок палии данные гаплотипы встречались в следующих долях. Финская выборка: А (100 %), выборка дикой палии Ладожского озера А (64 %), В (36 %) и выборка одомашненной палии ФСГРЦ Ропша А (71 %), В (29 %).

Полученные данные свидетельствуют о процессе снижения генетического разнообразия в финской заводской популяции. Иная картина ге-



Электрофоретические профили продуктов реакции ферментного гидролиза участка ND5/ND6 рестриктазой *Hae* III. М-маркер молекулярного веса

Таблица 4

**Размеры рестрикционных фрагментов (п.о.), полученных в результате обработки
трех участков мтДНК рестрикционными эндонуклеазами**

CR	<i>Alu I</i>	<i>FriO I</i>	<i>Dra I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>		<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Bme18 I</i>
	A			A			A	A	
1100 п.н.	950	–	–	700	–		600	950	–
	100			400			250	150	
	50						200		
ND3/ND4L/ND4 2 350 п.н.	A	A			A		A	A	
	750	1450	–	–	550		900	950	–
	350	650			500		850	600	
	300	250			400		270	550	
	150				330		250	250	
ND5/ND6 2 490 п.н.	A		A	A	A	B	A	A	A
	650	–	900	500	600	820	1450	1490	1700
	500		690	460	600	600	790	1000	790
	470		500	450	560	560	250		
	350		400	360	220	220			
	150			310	220	170			
	130			210	170	120			
				150	120				
				50					

нетического разнообразия наблюдается в остальных исследованных выборках. Соотношение частот гаплотипов в одомашненном стаде палии и дикой ладожской популяции сопоставимо, что свидетельствует о сохранении разнообразия палии в заводских условиях ФСГРЦ Ропша. Вероятно отличие финской палии связано не с межпопуляционными различиями, а с результатом заводского разведения, что указывает на необходимость тщательно планировать и контролировать результаты племенной работы с объектом, разводимым с целью поддержания природных популяций. При этом, обнаруженный нами изменчивый признак в митохондриальном геноме палии может быть использован в процессе мониторинга природных и аквакультурных популяций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Никандров В.Я., Павлисов А.А., Шиндавина Н.И., Лукин А.А., Голод В.М., Липатова М.И. Арктический голец (*Salvelinus alpinus* L.) — перспективный объект для аквакультуры Севера России // Арктика: экология и экономика. 2018.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Генетическая дифференциация трех симпатричных видов гольцов рода *Salvelinus* по данным PCR-RFLP анализа мтДНК // Генетика. 2003. Т. 39, № 8. С. 1099–1105.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков Вл.А., Крэйн П.А., Венбург Дж.К. Дифференциация мальмы *Salvelinus malma* Азии и Северной Америки по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2005. Т. 41, № 5. С. 626–634.
- Радченко О.А. Изменчивость митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus*. Магадан. 2005. 154 с.
- Attardi G. Animal Mitochondrial DNA: an Extreme Example of Genetic Economy // Int. Rev. Cytol. 1985. Vol. 93. P. 93–145.
- Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979. Vol. 76. Pp. 1967–1971.
- Birky C.W. The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models // Annu. Rev. Genet. 2001. Vol. 35. Pp. 125–148.