

РАЗВЕДЕНИЕ, СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ / BREEDING, SELECTION,
GENETICS AND BIOTECHNOLOGY OF ANIMALS

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.72>

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНОМЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ
С ОТДЕЛЬНЫМИ ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ

Научная статья

Терлецкий В.П.^{1,*}, Тыщенко В.И.²

²ORCID : 0000-0003-4964-9938;

^{1,2}Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (valeriter1[at]mail.ru)

Аннотация

Методы молекулярной генетики позволяют оценить как полный геном рыбы, так и выявить мутации в функционально важных генах. К числу таких генов можно отнести ген морфогенетического белка (*BMP-2*), являющегося транскрипционным фактором, регулирующим функциональную активность многих других генов. В частности, он связан с развитием мускулатуры и костной ткани, а также с формированием нервной системы и поведенческих признаков. Учитывая важность гена *BMP-2* в росте и развитии рыб, актуальной задачей является выявление однонуклеотидных замен в гене. В работе проведен *in-silico* поиск оптимальных праймеров к интронам гена для проведения полимеразной цепной реакции, чтобы наработать фрагменты ДНК для последующего секвенирования. По результатам секвенирования двух интронных участков гена *BMP-2* удалось выявить полиморфизмы, некоторые из которых оказались связанными с признаком объема эякулята у самцов. Эти данные позволяют учитывать генотип при подборе производителей с целью получения потомства с желательными аллелями и, следовательно, фенотипами.

Ключевые слова: радужная форель, однонуклеотидный полиморфизм, ассоциация.

ANALYSIS OF ASSOCIATIONS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE RAINBOW TROUT
GENOME WITH INDIVIDUAL PHENOTYPIC TRAITS

Research article

Terletsii V.P.^{1,*}, Tyshchenko V.I.²

²ORCID : 0000-0003-4964-9938;

^{1,2}All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals, Saint-Petersburg, Russian Federation

* Corresponding author (valeriter1[at]mail.ru)

Abstract

Molecular genetics methods allow to evaluate both the complete genome of fish and to detect mutations in functionally important genes. Among such genes is the one of morphogenetic protein (*BMP-2*), which is a transcription factor regulating the functional activity of many other genes. In particular, it is associated with the development of muscle and bone tissue, as well as with the formation of the nervous system and behavioural traits. Given the importance of the *BMP-2* gene in fish growth and development, the identification of single nucleotide substitutions in the gene is an urgent task. *In-silico* search of optimal primers to introns of the gene for polymerase chain reaction was carried out in order to generate DNA fragments for subsequent sequencing. The results of sequencing of two intronic regions of the *BMP-2* gene showed polymorphisms, some of which were associated with the trait of ejaculate volume in males. These data will make it possible to take genotype into account when selecting breeders in order to obtain offspring with desirable alleles and, consequently, phenotypes.

Keywords: rainbow trout, single nucleotide polymorphism, association.

Введение

Интенсивное ведение рыбного хозяйства подразумевает, прежде всего, использование аквакультуры в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ). К такому использованию пригодны не все виды рыб, однако форель является удобным объектом для выращивания в УЗВ. Селекционная работа с форелью направлена на выведение новых высокопродуктивных форм и пород рыбы, которые были бы наиболее приспособлены к условиям интенсивного выращивания, сохраняя при этом определенную пластичность и адаптационные способности. Относительно новое селекционное достижение – ропшинская золотая форель обладает привлекательной окраской чешуи и сохраняет все лучшие продуктивные качества рыбы с обычной окраской. Аквакультура приобретает сейчас все большее значение в рыбководстве, так как позволяет получить значительную прибавку продукции на единицу площади в сравнении с ресурсами, извлекаемыми из природных водных бассейнов. Среди видов рыб, приспособленных к условиям интенсивного выращивания в аквакультуре, выделяется радужная форель. Она является источником ценного диетического питания, быстро растет и генетически пластична, что дало возможность селекционерам вывести много пород, удовлетворяющих самым разным потребностям [1], [2].

Развитие генетических технологий предоставило научное обоснование многих селекционных программ и ускорило появление новых высокопродуктивных форм радужной форели. В СГЦ рыбководства (пос. Ропша, Ленинградская обл.) сравнительно недавно было достигнуто новое селекционное достижение – ропшинская золотая

форель, отличающаяся привлекательным внешним видом и сохранившая при этом все лучшие характеристики форели с традиционной окраской чешуи [3], [4], [5]. Зная генетические особенности новых форм рыбы, можно эффективнее планировать работу для дальнейшего совершенствования рыбы. Актуальными вопросами в рыбоводстве являются характеристика поголовья на предмет генетических различий между популяциями, вариабельности внутри групп и т.д. Важным направлением работ является интрогрессия ценных генов в новые популяции, что улучшает их хозяйственно-ценные признаки. Скрещивание генетически различных пород и популяций ставит своей целью получение эффекта гетерозиса [4]. Одним из успешных применений селекции, направленной на повышение внутривидового разнообразия (гетерозиготности) является создание породы радужной форели рофор. В силу заложенного в особях разнообразия рыба хорошо приспосабливается к меняющимся условиям содержания (новые корма, изменение температуры и т.д.). Молекулярная генетика все активнее используется в решении как фундаментальных вопросов генетики рыб, так и в решении практических задач.

Важным направлением генетических исследований является выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), локализующихся в важных для роста и развития рыбы генах [6], [7]. К числу таких генов можно отнести морфогенетический ген, такой как *BMP-2*, являющийся транскрипционным фактором для целого ряда других генов [8], [9], [10]. В частности, мутации в гене связаны с развитием костной и мышечной тканей у рыбы, формированием нервной системы и развития поведенческих признаков [11], [12]. Экзоны гена уже изучались ранее, были установлены ассоциации между полиморфизмами и продуктивными признаками. Известно, что интроны у животных могут иметь регуляторную функцию, модулируя экспрессию генов, поэтому интерес представляет выявление в них мутаций и связи последних с формированием фенотипических признаков. Ген *BMP-2* является довольно консервативным, т.е. встречается у многих позвоночных, при этом у каждого вида существует несколько вариантов этого гена [13]. Мутации в экзонах генов часто приводят к изменению аминокислотной последовательности в кодируемых этими генами белках, что сказывается на формировании фенотипа. Интроны генов не принимают непосредственного участия в детерминировании первичной структуры белка, однако, могут играть роль в регуляции экспрессии генов. Все эти научные факты предопределили стремление более глубоко изучить наличие SNP в интронах гена и выявить их связь с фенотипическими признаками у ропшинской золотой форели [14], [15].

Цель исследования – выявить однонуклеотидные полиморфизмы в интронных участках гена *BMP-2* и связать их наличие с продуктивными признаками, учтенными при бонитировке самцов радужной форели – ропшинская золотая форель.

Методы и принципы исследования

Объектом исследования были самцы радужной форели относительно новой селекционной формы – ропшинская золотая форель возрастом 2 года, в количестве 16 особей.

Длину тела и другие метрические параметры измеряли во время плановых бонитировок с помощью мерной доски. Для упрощения процедуры рыбу временно иммобилизовали гвоздичным маслом. Учитывали следующие размерно-весовые характеристики (масса тела, длина тела по Смиту, длина чешуйчатого покрова, длина головы, высота и толщина тела), а также репродуктивные показатели у самок – вес икры, масса одной икринки, количество икры в 5 граммах и самцов – объем эякулята и подвижность сперматозоидов. Этот этап работы проводился в рамках плановых бонитировок на базе СГЦ рыбоводства (пос. Ропша, Ленинградской обл.). Во время бонитировки брали биологический материал в виде кусочка ткани, который замораживали для последующей доставки в лабораторию молекулярной генетики ВНИИГРЖ (Санкт-Петербург, Пушкин). Выделение геномной ДНК проводили обычным фенольным способом после лизиса клеток додецилсульфатом натрия и депротенизации ферментом протеиназа К. В качестве анализируемого гена был выбран ген *BMP-2* на четвертой хромосоме, кодирующий костный морфогенетический белок 2. *In-silico* поиск в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI позволил выбрать два интрона, к нуклеотидным последовательностям которых провели дизайн праймеров с помощью онлайн программы Primer 3 Plus для амплификации этих участков.

Амплификацию фрагментов ДНК проводили в приборе Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, США) с использованием следующих режимов: 95°C – 20 сек., 60°C – 20 сек., 72°C – 20 сек. и финальная элонгация 72°C – 4 минуты. Часть амплификата проверяли в 1,5% агарозном геле. Затем продукт ПЦР очищали на микроколонках методом гель-фильтрации для удаления всех низкомолекулярных примесей, включая соли. Секвенирование очищенной ДНК проводили в секвенаторе Genetic Analyzer 3500 фирмы Applied Biosystems™ с применением рекомендованных производителем наборов BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit. После получения данных о нуклеотидных последовательностях в изучаемых интронах всех 32 особей проводили выравнивание, используя программный пакет MEGA 6.06 (<https://www.megasoftware.net>) с целью выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Биометрическая обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica 10.

Основные результаты

Секвенирование двух интронных участков гена *BMP-2*, локализованного на хромосоме 4, выявило ряд нуклеотидных замен у самцов радужной форели (табл. 1).

Таблица 1 - Замены нуклеотидов в интронах гена *BMP-2* на 4-й хромосоме у самцов и частоты генотипов

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.72.1>

SNP	BMP-2_1-IN		BMP-2_1-IN		BMP-2_2-IN	
Позиция	A70824829G		G70824841T		G70826709A	
	Генотип, n	Частота	Генотип, n	Частота	Генотип, n	Частота

Ропшинская золотая	AA=9	0,563	GG=0	0,000	AA=1	0,063
	AG=6	0,375	GT=13	0,813	AG=6	0,375
	GG=1	0,063	TT=3	0,188	GG=9	0,563

Анализ ассоциаций генотипов с размерно-весовыми и продуктивными признаками позволил доказать влияние замен нуклеотидов на фенотип. Интересно, что мутация в интронном участке изучаемого гена в позиции G70824841T у самцов привела к статистически значимым различиям у носителей генотипов GT и TT по объему эякулята (табл. 2). Несмотря на небольшое число носителей генотипа TT (3 особи) анализ показал статистически значимые различия между генотипами TT и GT. Самцы генотипа GT превосходили самцов генотипа TT (5,07 против 3,43 мл). По другим признакам различий между генотипами выявлено не было, что может быть связано с небольшой выборкой.

Таблица 2 - Ассоциации генотипов в гене BMP-2_1N (позиция G70824841T) на 4-й хромосоме с фенотипическими признаками у самцов золотой форели

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.72.2>

G70824841T	Генотип	Генотип
Позиция	GT (n=13)	TT (n=3)
Масса рыбы, г	663,85±40,81	695,00±79,11
Длина тела по Смитсу, см	34,57±0,73	36,57±1,67
V эякулята, мл	5,07±0,38 ^a	3,43±0,28 ^b
Подвижность, сек/%	25,85±0,55	25,67±1,33

Примечание: GT/TT (a-b, P < 0,01)

Заключение

Таким образом, выявленные в ходе секвенирования однонуклеотидные полиморфизмы в одном из интронных участков гена BMP-2 (позиция G70824841T) оказались ассоциированы с таким важным селекционным признаком у самцов радужной форели, как объем эякулята. По другим бонитировочным показателям статистически значимой разницы между генотипами не установлено, что может быть связано с небольшой выборкой. Увеличение количества особей, возможно, приведет к выявлению и других ассоциаций. Следовательно, выявление однонуклеотидных полиморфизмов с последующим анализом ассоциаций с фенотипическими признаками является плодотворным при планировании селекционной работы с рыбой для подбора пар производителей с целью получения потомства, несущего желательные генотипы.

Благодарности

Работа проведена в рамках выполнения научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме ГЗ № 124020200114-7.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Сообщество рецензентов Международного научно-исследовательского журнала
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.72.3>

Acknowledgement

The work was carried out within the scientific research of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the theme GZ No. 124020200114-7.

Conflict of Interest

None declared.

Review

International Research Journal Reviewers Community
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.72.3>

Список литературы / References

- Животовский Л.А. Генетическая история лососевых рыб рода *Oncorhynchus* / Л.А. Животовский // Генетика. — 2015. — № 51. — С. 584–599. — DOI: 10.7868/S0016675815050100
- Leeds T.D. Response to five generations of selection for growth performance traits in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / T.D. Leeds, R.L. Vallejo, G.M. Weber et al. // Aquaculture. — 2016. — 465. — P. 341–351. — DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.08.036
- Никандров В.Я. Характеристика радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) желтой окраски, полученной в результате парных скрещиваний / В.Я. Никандров, Н.И. Шиндавина, В.М. Голод и др. // Вестник рыбохозяйственной науки. — 2015. — Т. 2. — № 3(7). — С. 57–65.
- Никандров В.Я. Характеристика первого поколения радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) желтой окраски, полученной в результате парных скрещиваний / В.Я. Никандров, Н.И. Шиндавина, Е.Г. Терентьева и др. // Рыбное хозяйство. — 2016. — 5. — С. 76–82.

5. Никандров В.Я. Новое селекционное достижение – форель ропшинская золотая / В.Я. Никандров, Н.И. Шиндавина, В.М. Голод // Рыбное хозяйство. — 2019. — 4. — С. 83–88.
6. Su S.Y. Molecular cloning and single nucleotide polymorphism analysis of IGF2a genes in the common carp (*Cyprinus carpio*) / S.Y. Su, Z.J. Dong, J.Q. Qu et al. // Genetics and Molecular Research. — 2012. — 11. — P. 1327–1340. — DOI: 10.4238/2012.May.15.3
7. Karami A.M. Validation of a QTL associated with resistance to *Vibrio anguillarum* in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / A.M. Karami, M.H. Marana, H. Mathiessen et al. // Acta Vet. Scand. — 2023. — 65 (1). — DOI: 10.1186/s13028-023-00692-z
8. Yang G. Comparative genomic and transcriptional survey providing novel insights into bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in fishes / G. Yang, Z. Qin, H. Kou et al. // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — 20 (24). — DOI: 10.3390/ijms20246137
9. Zhang W.Z. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream / W.Z. Zhang, T. Lan, C.H. Nie et al. // Gene. — 2018. — 642. — P. 116–124. — DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.027
10. Christian J. A tale of two receptors: Bmp heterodimers recruit two type I receptors but use the kinase activity of only one / J. Christian // Proceedings of National Academic Science USA. — 2021. — 118 (19). — DOI: 10.1073/pnas.2104745118
11. Li B. Molecular mechanisms of intermuscular bone development in fish: a review / B. Li, Y.W. Zhang, X. Liu et al. // Zoological Research. — 2021. — 42 (3). — P. 362–376. — DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.044
12. Dong G. Mypt1 regulates Bmp signaling to promote embryonic exocrine pancreas growth in zebrafish / G. Dong, Y. Huang, H. Ding et al. // Genesis. — 2020. — 58 (2). — DOI: 10.1002/dvg.23345
13. Wu Y. Functional differentiation of BMP2a and BMP2b genes in zebrafish / Y. Wu, A. Sun, C. Nie et al. // Gene Expression Patterns. — 2022. — 46. — DOI: 10.1016/j.gep.2022.119288
14. Тыщенко В.И. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов гене BMP-2 и их ассоциаций с продуктивными признаками радужной форели / В.И. Тыщенко, Ю.С. Щербаков, О.А. Николаева и др. // Аграрная наука. — 2024. — 8. — С. 145–149. — DOI: 10.32634/0869-8155-2024-385-8-145-149
15. Щербаков Ю.С. Ассоциации аллельных вариантов генов FAM60A, EGR1, BCL2L11, BMP-2, уровня экспрессии гена BMP-2 с хозяйственно-полезными признаками у радужной форели : дис. ...канд. : 04.02.05. : защищена 2023-12-07 : утв. 2024-08-31 / Ю.С. Щербаков. — Подольск : 2024. — 113 с.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Zhivotovskij L.A. Geneticheskaja istorija lososevyh ryb roda *Oncorhynchus* [Genetic history of salmonid fishes of the genus *Oncorhynchus*] / L.A. Zhivotovskij // Genetika [Russian Journal of Genetics]. — 2015. — № 51. — P. 584–599. — DOI: 10.7868/S0016675815050100 [in Russian]
2. Leeds T.D. Response to five generations of selection for growth performance traits in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / T.D. Leeds, R.L. Vallejo, G.M. Weber et al. // Aquaculture. — 2016. — 465. — P. 341–351. — DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.08.036
3. Nikandrov V.Ja. Harakteristika raduzhnoj foreli (*Oncorhynchus mykiss*) zheltoj okraski, poluchennoj v rezul'tate parnyh skreschivanij [Characteristics of yellow body color Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) produced by pair crossing] / V.Ja. Nikandrov, N.I. Shindavina, V.M. Golod et al. // Vestnik rybohozjajstvennoj nauki [Proceedings of Fish Farming Science]. — 2015. — Vol. 2. — № 3(7). — P. 57–65. [in Russian]
4. Nikandrov V.Ja. Harakteristika pervogo pokolenija raduzhnoj foreli (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) zheltoj okraski, poluchennoj v rezul'tate parnyh skreschivanij [Characteristics of the first generation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) with yellow coloration obtained as a result of paired crossings] / V.Ja. Nikandrov, N.I. Shindavina, E.G. Terent'eva et al. // Rybnoe hozjajstvo [Fish Farming]. — 2016. — 5. — P. 76–82. [in Russian]
5. Nikandrov V.Ja. Novoe selekcionnoe dostizhenie – forel' ropshinskaja zolotaja [New breeding achievement – trout Ropshinskaya golden] / V.Ja. Nikandrov, N.I. Shindavina, V.M. Golod // Rybnoe hozjajstvo [Fish Farming]. — 2019. — 4. — P. 83–88. [in Russian]
6. Su S.Y. Molecular cloning and single nucleotide polymorphism analysis of IGF2a genes in the common carp (*Cyprinus carpio*) / S.Y. Su, Z.J. Dong, J.Q. Qu et al. // Genetics and Molecular Research. — 2012. — 11. — P. 1327–1340. — DOI: 10.4238/2012.May.15.3
7. Karami A.M. Validation of a QTL associated with resistance to *Vibrio anguillarum* in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / A.M. Karami, M.H. Marana, H. Mathiessen et al. // Acta Vet. Scand. — 2023. — 65 (1). — DOI: 10.1186/s13028-023-00692-z
8. Yang G. Comparative genomic and transcriptional survey providing novel insights into bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in fishes / G. Yang, Z. Qin, H. Kou et al. // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — 20 (24). — DOI: 10.3390/ijms20246137
9. Zhang W.Z. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream / W.Z. Zhang, T. Lan, C.H. Nie et al. // Gene. — 2018. — 642. — P. 116–124. — DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.027
10. Christian J. A tale of two receptors: Bmp heterodimers recruit two type I receptors but use the kinase activity of only one / J. Christian // Proceedings of National Academic Science USA. — 2021. — 118 (19). — DOI: 10.1073/pnas.2104745118
11. Li B. Molecular mechanisms of intermuscular bone development in fish: a review / B. Li, Y.W. Zhang, X. Liu et al. // Zoological Research. — 2021. — 42 (3). — P. 362–376. — DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.044
12. Dong G. Mypt1 regulates Bmp signaling to promote embryonic exocrine pancreas growth in zebrafish / G. Dong, Y. Huang, H. Ding et al. // Genesis. — 2020. — 58 (2). — DOI: 10.1002/dvg.23345

13. Wu Y. Functional differentiation of BMP2a and BMP2b genes in zebrafish / Y. Wu, A. Sun, C. Nie et al. // Gene Expression Patterns. — 2022. — 46. — DOI: 10.1016/j.gep.2022.119288
14. Tyschenko V.I. Vyjavlenie odnonukleotidnyh polimorfizmov gene BMP-2 i ih assotsiatsij s produktivnymi priznakami raduzhnoj foreli [Identification of single nucleotide polymorphisms in BMP-2 gene and their associations with productive traits in Rainbow trout] / V.I. Tyschenko, Ju.S. Scherbakov, O.A. Nikolaeva et al. // Agrarian Science. — 2024. — 8. — P. 145–149. — DOI: 10.32634/0869-8155-2024-385-8-145-149 [in Russian]
15. Scherbakov Ju.S. Assotsiatsii allel'nyh variantov genov FAM60A, EGR1, BCL2L11, BMP-2, urovnja ekspressii gena BMP-2 s hozjajstvenno-poleznymi priznakami u raduzhnoj foreli [Association of allele variants in FAM60A, EGR1, BCL2L11, BMP-2 genes, expression level of BMP-2 gene with productive traits in Rainbow trout] : dis...of PhD in Natural sciences : 04.02.05. : defense of the thesis 2023-12-07 : approved 2024-08-31 / Ju.S. Scherbakov. — Podol'sk : 2024. — 113 p. [in Russian]