

РЫБНОЕ ХОЗЯЙСТВО, АКВАКУЛЬТУРА И ПРОМЫШЛЕННОЕ РЫБОЛОВСТВО / FISHERIES,
AQUACULTURE AND INDUSTRIAL FISHERIES

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.92>

ПОИСК АССОЦИАЦИЙ ПРОДУКТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ С
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫМИ ПОЛИМОРФИЗМАМИ В ГЕНАХ *EGR1*, *FAM60A*, *BCL2L11*

Научная статья

Щербаков Ю.С.¹, Терлецкий В.П.² *

¹ORCID : 0000-0001-6434-6287;

²ORCID : 0000-0003-4043-3823;

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

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

Аннотация

Радужная форель является одним из самых экономически ценных объектов аквакультуры в мире. Важным экономическим аспектом для хозяйств по выращиванию радужной форели является изучение генетических маркеров и ведение маркерной селекции с целью улучшения показателей выхода товарной продукции. Оценка и ассоциация метрических показателей с генотипами радужной форели, помогут выбраковать особей с нежелательными отклонениями в росте и развитии. Полученные данные могут улучшить селекционные мероприятия, которые проводятся на хозяйствах по выращиванию товарной продукции радужной форели. В исследовании приведены данные по использованию современных статистических подходов для анализа результатов бонитировки и полученных последовательностей в результате секвенирования образцов ДНК радужной форели. В результате проведенного исследования были обнаружены достоверные данные о связи генотипа SNP в генах *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1* с метрическими показателями производителей радужной форели, масса тела, длина головы, высота тела.

Ключевые слова: радужная форель, полиморфизм, ген, *EGR1*, *FAM60A*, *BCL2L11*.

THE SEARCH FOR ASSOCIATIONS OF RAINBOW TROUT PERFORMANCE WITH SINGLE NUCLEOTIDE
POLYMORPHISMS IN THE *EGR1*, *FAM60A*, AND *BCL2L11* GENES

Research article

Shcherbakov Y.S.¹, Terletskiy V.P.² *

¹ORCID : 0000-0001-6434-6287;

²ORCID : 0000-0003-4043-3823;

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

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

Abstract

Rainbow trout are one of the most economically valuable aquaculture species in the world. An important economic aspect for rainbow trout farms is the study of genetic markers and marker breeding to improve commercial yields. Evaluation and association of metrics with rainbow trout genotypes will help to cull fish with undesirable growth and developmental abnormalities. The data obtained can improve the breeding efforts of commercial rainbow trout farms. The research provides data on the use of modern statistical approaches to analyse the results of boning and sequencing of rainbow trout DNA samples. As a result of this study, reliable data on the association of SNP genotype in the genes *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1* with the metrics of rainbow trout producers, body weight, head length, and body height were revealed.

Keywords: rainbow trout, polymorphism, gene, *EGR1*, *FAM60A*, *BCL2L11*.

Введение

На сегодняшний день ведется активное развитие аквакультуры, Радужная форель является одним из самых распространённых объектов холодноводных хозяйств товарного рыбоводства. Введение в оборот новых высокопродуктивных пород форели повышает экономическую эффективность рыбоводства. При этом большое внимание уделяется генетическим исследованиям популяций рыб, что обеспечивает паспортизацию пород и поддержание научно-обоснованного уровня генетического разнообразия. Активно развиваются методы изучения геномной архитектуры животных. Радужная форель является важным объектом для научных исследований, т.к. имеет ряд интересных биологических особенностей, например, наличие триплоидных и тетраплоидных особей. Появился метод, способный на полногеномном уровне изучать изменчивость и дивергенцию популяций радужной форели [1], [3], [5], [8]. С помощью чипов стал возможен полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Studies) — направление биологических исследований, связанных с изучением связей между геномными вариантами и фенотипическими признаками. В настоящее время с помощью GWAS анализа изучены ассоциации с интенсивностью роста, срокам созревания и по живой массе лососевых (7; 10 4). Секвенирование генома атлантического лосося сыграло ключевую роль в понимании эволюционных и функциональных последствий, возникающих из-за наследственной дупликации целого генома, характерного для всех представителей семейства *Salmonidae*. Первым представителем *Salmonidae*, высококачественная сборка генома которого была опубликована в 2016 году, был

атлантический лосось (*Salmo salar*). Высокопроизводительное секвенирование изменило подход к изучению генетики лосося, в частности, упростило создание наборов маркеров.

Такие признаки как масса тела и длина, у лосося колеблются от низкой до высокой, эти признаки считаются полигенными и включают сотни генов-кандидатов (11 б). Известны несколько генов, которые определяют такой важный в рыбоводстве признак как живая масса. Такими генами являются *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1* (9). Первые два из них связаны с регуляцией клеточного цикла, что прямо детерминирует накопление мышечной массы. *EGR1*, расположенный на 28 хромосоме, являясь транскрипционным фактором, непосредственно регулирует факторы роста, обеспечивая процессы ангиогенеза и накопления мышечной массы. Таким образом, выявление новых аллелей в генах, связанных с развитием мышечной массы является актуальной задачей для совершенствования селекционного процесса при разведении рыб в аквакультуре.

Цель работы: установить связь SNP обнаруженных в экзонах генов *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1* с метрическими показателями.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- подобрать праймеры к экзонам генов *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1*;
- провести секвенирование полученных амплифицированных участков;
- провести статистический анализ полученных результатов.

Материалы и методы

Сбор материала проводился на базе Федерального селекционно-генетического центра рыбоводства, который расположен в поселке Ропша Ленинградской области. Объектом исследования служила популяция производителей радужной форели новой породы ропшинская золотая, в возрасте трех лет. С производителей были сняты метрические показатели (масса тела, длина тела по Смиту, длина до конца чешуйчатого покрова, длина головы, высота тела, толщина тела) с помощью мерной доски. Экстракцию ДНК проводили фенольно-детергентным методом с применением протеиназы К для очистки образцов от белков. Оценивали качество и количество ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000, при этом соотношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм было не меньше 1,8. Праймеры к изучаемым генам подбирались с помощью сервиса NCBI Primer BLAST. Задавали следующие критерии для праймеров: длина не менее 20 и не более 25 нуклеотидов, GC-содержание в пределах 45-55%, разность в температурах плавления прямого и обратного праймеров не более 1°C и длина амплификата в пределах 500-700 пар оснований. Секвенирование полученных продуктов амплификации проводили с помощью генетического анализатора 3500 Applied Biosystems согласно протоколу производителя. Полученные последовательности были проанализированы и выровнены в программе MEGA X. Достоверность разницы оценивалась с помощью t-критерий (или критерий Стьюдента) по формуле:

$$p = \frac{M1-M2}{\sqrt{m1^2+m2^2}}$$

где p — величина вычисленного эмпирического критерия, который необходимо сравнивать с критическим; $M1$ и $M2$ — значения сравниваемых средних арифметических; $m1$ и $m2$ — соответствующие величины статистических ошибок средних арифметических.

Результаты

В результате анализа базы данных NCBI были подобраны праймеры с помощью сервиса Primer BLAST (Таблица 1).

Таблица 1 - Праймеры используемые для получения продуктов ПЦР для секвенирования

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.92.1>

Праймер	Температура отжига °C	Длина фрагмента п.н.
EGR1 F_CAAGGGTCTTCTCTTGAA GCTG R_CTGCTCCCGAAAGTGGA CTG	60	578
BCL2L11 F_TATGGTGGTCAGCCAAGA CC R_CCAGATCCGTGCAGGAA ACA	60	654
FAM60A F_CCAATTTGTGGCGGCATTC TC R_AGATGTTTACTGATTTGC TTGGTGT	60	566

В результате были получены качественные амплифицированные участки методом ПЦР. Состав смеси для проведения ПЦР был следующий: вода 13,6 мкл, буфер 2 мкл, dNTP 2,4 мкл, праймеры прямой и обратный по 0,4 мкл, Taq полимераза 0,4 мкл, ДНК 1 мкл.

Полученные продукты амплификации были секвенированы. В результате проведенного анализа полученных последовательностей были обнаружены: один SNP в экзоне гена *EGR1*, один SNP в экзоне гена *BCL2L11* и 3 SNP в экзоне гена *FAM60A*. Полученные генотипы были связаны с метрическими показателями рассчитаны средние величины и стандартные ошибки. Полученные результаты занесены в таблицу 2.

Таблица 2 - Распределение средних величин по генотипам рыб

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.92.2>

Генотип SNP	Масса гр	Длина тела по Смигу см	Длина тела до конца чешуйчатого покрова см	Длина головы см	Высота тела см	Толщина тела см
EGR1_AA	1880,00±220,00	50,85±2,05	47,40±1,60	10,50±0,50	13,25±0,25 _a	5,75±0,45
EGR1_AT	1165,00±265,00	43,90±3,10	40,15±2,85	10,10±0,60	11,45±0,45 _b	4,70±0,60
EGR1_TT	1752,50±254,80	47,52±1,88	43,82±1,61	9,75±0,44	13,43±0,87	5,80±0,48
BCL2L11_AA	1480,00±580,00	45,40±4,60	41,65±4,35	9,40±0,10 _c	12,95±1,95	5,05±0,95
BCL2L11_AG	1757,50±256,20	48,50±1,93	44,65±1,72	10,23±0,34 _d	13,15±0,83	5,78±0,49
FAM60A_1_AA	1742,36±359,87	47,34±2,69	43,62±2,53	9,76±0,22 _e	13,30±1,13	5,66±0,69
FAM60A_1_AT	1567,5±92,50	47,40±1,40	44,40±1,40	11,25±0,25 _f	12,70±0,30	5,25±0,05
FAM60A_1_TT	1586,67±151,69	47,70±2,36	43,70±1,79	9,47±0,65	12,70±0,66	5,63±0,20
FAM60A_2_CT	1599,00±219,68 _h	46,76±2,13	43,36±1,94	9,76±0,50	12,72±0,72	5,44±0,35
FAM60A_2_TT	1927,50±283,50 _g	50,00±1,27	45,97±1,09	10,35±0,40	13,85±0,98	6,10±0,59
FAM60A_3_AA	1597,14±245,79	46,64±1,88	43,13±1,77	9,96±0,33	12,67±0,76	5,50±0,48
FAM60A_3_CC	1975,00±85,00	51,05±1,05	46,55±0,55	9,25±0,05	14,45±0,45	6,00±0,00

Примечание: a-b, c-d p-value = 0,05; e-f, g-h p-value = 0,01

В экзоне гена *EGR1* был обнаружен один SNP (A/T). Было отмечено, что особи с генотипом AA превосходят особей с генотипом AT по показателю высота тела (p-value = 0,05). По остальным показателям достоверных различий не было отмечено.

В экзоне гена *BCL2L11* был обнаружен один SNP (A/G). Отмечено, что рыбы с генотипом AG превосходят рыб с генотипом AA по показателю длина головы (p-value = 0,05). По остальным показателям достоверных различий не было отмечено.

В экзоне гена *FAM60A(SINHCAFL)* были обнаружены три однонуклеотидных (A/T, C/T, A/C). В первом SNP (A/T) особи с генотипом AA превосходили особей с генотипом AT по показателю длина головы (p-value= 0,01). Рыбы с генотипом AT превосходили рыб с генотипом TT по показателю длина головы (p-value=0,05). Во втором SNP у особей с генотипом TT превосходили особей с генотипом CT по массе тела (p-value= 0,01). В третьем SNP не было обнаружено достоверной разницы. Очевидно, при отборе производителей лучше использовать генотипы с учетом указанных SNP сразу по трем генам, что повысит эффект селекционной работы с рыбой.

Заключение

В результате проведенного исследования были обнаружены достоверные данные о связи генотипа SNP в генах *FAM60A*, *BCL2L11*, *EGR1* с отдельными метрическими показателями производителей радужной форели. На основании полученных данных можно вести маркерную селекцию с подбором производителей радужной форели с целью улучшения продуктивных показателей у потомков.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-90020 (Щербаков Ю.С.)

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Касьянов Г.И., Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Российская Федерация, Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Российская Федерация
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.92.3>

Funding

The research was completed under financial support of RFBR under project No 20-316-90020 (Shcherbakov Yu.S.)

Conflict of Interest

None declared.

Review

Kasyanov G.I., Краснодарский край, Krasnodar, Russian Federation, Kuban State Technological University, Krasnodar, Russian Federation
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.92.3>

Список литературы на английском языке / References in English

1. Amish S.J. Assessing thermal adaptation using familybased association and FST -outlier tests in a threatened trout / S.J. Amish, O. Ali, M. Peacock et al. // *Molecular Ecology*. — 2019. — 28(10). — p. 2573-2593.
2. Barria A. Population Genomic Structure and Genome-Wide Linkage Disequilibrium in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Using Dense SNP Genotypes / A. Barria, M.E. López, G. Yoshida et al. // *Frontiers in Genetics*. — 2018. — 9. — p. 649.
3. Barría A. Whole Genome Linkage Disequilibrium and Effective Population Size in a Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Breeding Population Using a High-Density SNP Array / A. Barría, K.A. Christensen, G. Yoshida et al. // *Frontiers in Genetics*. — 2019. — 10. — p. 498.
4. Barson N.J. Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon / N.J. Barson, T. Aykanat, K. Hindar et al. // *Nature*. — 2015. — 528(7582). — p. 405-408. — DOI:10.1038/nature16062.
5. Gabián M. Identification of genomic regions regulating sex determination in Atlantic salmon using high density SNP data / M. Gabián, P. Morán, A.I. Fernández et al. // *BMC Genomics*. — 2019. — 20(1). — p. 764.
6. Gao G. A New Single Nucleotide Polymorphism Database for Rainbow Trout Generated Through Whole Genome Resequencing / G. Gao, T. Nome, D.E. Pearse et al. // *Frontiers in Genetics*. — 2018. — 9. — p. 147.
7. Alejandro P.G. Genome-Wide Association Study (GWAS) for Growth Rate and Age at Sexual Maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) / P.G. Alejandro, J.M. Yáñez, S. Fukui // *Plos one*. — 2015. — 10(3). — p. e0119730.
8. Kijas J. Diversity and linkage disequilibrium in farmed Tasmanian Atlantic salmon / J. Kijas, N. Elliot, P. Kube et al. // *Animal Genetics*. — 2016. — 48(2). — p. 237-241. — DOI:10.1111/age.12513.
9. Reis N.R.V. Genome-wide association analysis for body weight identifies candidate genes related to development and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / N.R.V. Reis, G.M. Yoshida, J.P. Lhorente et al. // *Mol Genet Genomics*. — 2019. — 294(3). — p. 563-571. — DOI: 10.1007/s00438-018-1518-2.
10. Tsai H.Y. The genetic architecture of growth and fillet traits in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) / H.Y. Tsai, A. Hamilton, D.R. Guy et al. // *BMC Genetics*. — 2015. — 16(51). — DOI: 10.1186/s12863-015-0215-y
11. Yoshida G.M. Bayesian genome-wide association analysis for body weight in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / G.M. Yoshida, J.P. Lhorente, R. Carvalheiro // *Animal genetics*. — 2017. — 48(6). — p. 698-703. — DOI: 10.1111/age.12621.