

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА БЕЛОГО
(*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) И ПЕСТРОГО (*H. nobilis* Rich.)
ТОЛСТОЛОБИКОВ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ**

© 2020 г. А. Ю. Носова¹, В. Н. Кипень¹, *, А. И. Царь¹, В. А. Лемеш¹, **

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, 220072 Республика Беларусь

*e-mail: v.kipen@igc.by

**e-mail: v.lemesh@igc.by

Поступила в редакцию 22.03.2019 г.

После доработки 15.05.2019 г.

Принята к публикации 16.07.2019 г.

В работе дана оценка дифференцирующего потенциала 11 микросателлитных локусов – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40 – для различения белого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) и пестрого (*H. nobilis* Rich.) толстолобиков с использованием молекулярно-генетического анализа. Наибольшие рассчитанные значения F_{ST} показаны для STR-локусов Hmo15 (0.5235), Hmo33 (0.4957), Hmo40 (0.3500), Hmo25 (0.3365) и Hmo31 (0.2458). Точность классификации пестрых толстолобиков с использованием данных микросателлитных локусов составила $99.5 \pm 0.3\%$, белых толстолобиков – $99.4 \pm 0.8\%$. С использованием пяти STR-локусов предложена схема для выявления гибридных особей между пестрым и белым толстолобиками, выращиваемых в аквакультуре на территории Республики Беларусь. Данный подход может быть использован в качестве экспресс-теста в селекционных и воспроизводительных программах для данных видов растительноядных рыб.

Ключевые слова: белый толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix* Val., пестрый толстолобик *Hypophthalmichthys nobilis* Rich., микросателлитные локусы, short tandem repeat (STR), аллель, индекс фиксации F_{ST} , дифференциация, гибриды.

DOI: 10.31857/S0016675820030121

В условиях коммерческой аквакультуры с довольно высокой частотой происходит скрещивание между белым (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) и пестрым (*H. nobilis* Rich.) толстолобиками. Для повышения эффективности формирования ремонтных групп данных видов и в дальнейшем для отбора из них элитных низкоинбредных экземпляров в маточное стадо должны учитываться генетическая и фенотипическая изменчивость, а также физиологическое состояние. При формировании маточных стад растительноядных рыб необходимо использовать как минимум двухлинейное разведение – воспроизводство двух неродственных групп рыб с подбором самок и самцов различного происхождения. Это позволит избежать близкородственного скрещивания и рассчитывать на получение высокопродуктивного, быстрорастущего рыбопосадочного материала.

При сравнении диких и искусственных (заводских) популяций карпа из разных частей ареала было показано, что максимальные оценки гене-

тической изменчивости характерны для природных аутбредных популяций. При искусственном воспроизводстве может наблюдаться снижение уровня полиморфизма за счет эффекта основателя и выраженной инбредной депрессии [1, 2]. Ранее показано, что одними из наиболее доступных и информативных показателей полиморфизма для природных популяций рыб являются оценки аллельного разнообразия и гетерозиготности [3]. Оценка генетического разнообразия для особей белого и пестрого толстолобиков с использованием STR-локусов была проведена в работах Gheyas et al., Feng et al., Wang et al. и др. [4–10].

В предыдущем нашем исследовании по данным генотипирования 11 STR-локусов (Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40) дана оценка генетического разнообразия производителей белого (БТ) и пестрого (ПТ) толстолобиков, разводимых в отделении “Белоозерское” ОАО “Опытный рыбхоз “Селец”” (агргородок Селец, Брестская обл.)

[11], который является единственным держателем маточных стад белого и пестрого толстолобиков на территории Республики Беларусь. Полученные результаты позволили сделать заключение о достаточно высоком генетическом разнообразии изученных выборок белого и пестрого толстолобиков, вплоть до возможности выделить несколько групп для последующей работы по получению линейного материала и дальнейшего воспроизводства. Однако открытым оставался вопрос о возможности идентификации среди изученных выборок производителей гибридных особей белого и пестрого толстолобиков с использованием молекулярно-генетического анализа.

Межвидовая гибридизация и последующая интрогрессия между белым и пестрым толстолобиками потенциально могут иметь негативные последствия для маточных и ремонтных стад, а также для эффективности их применения в аквакультуре. В то же время эффект гетерозиса для потомства белого и пестрого толстолобика изучен в недостаточной степени для использования его в коммерческой аквакультуре [12].

Ранее в ряде исследований была продемонстрирована возможность с использованием STR-локусов дифференцировать особи близкородственных видов [13–15] или даже проводить классификацию особей с высокой точностью в пределах подвидов [16]. По данным Mia et al. [17] аллельные вариации по ряду STR-локусов позволяют также различать белого и пестрого толстолобиков, сводя к минимуму ошибки идентификации по фенотипическим признакам. Однако полученные исследователями результаты в одном географическом регионе не могут быть прямо перенесены на другие выборки за пределами исследуемой территории по причине различия популяционных частот. В этой связи любая предлагаемая исследователями схема дифференциации близкородственных видов должна быть адаптирована под новую территориальную единицу.

Таким образом, цель настоящего исследования – оценить дифференцирующий потенциал 11 STR-локусов (Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40) для идентификации гибридных особей белого и пестрого толстолобиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили образцы тканей от 129 производителей растительноядных рыб (ПТ – 63 особи, БТ – 66 особей), отобранных в отделении “Белоозерское” ОАО “Опытный рыбхоз “Селец””.

В качестве биологических проб для молекулярно-генетических исследований использовался биопсийный материал (плавники, мышечная

ткань, кровь и др.). Выделение тотальной ДНК проводили с использованием коммерческих наборов DNA Purification Kit (ThermoFisherScientific®, США), ДНК-сорб-С (AmpliSens®, РФ), а также методик фенол-хлороформной и солевой экстракции [18] с модификациями.

Проведен анализ разнообразия аллелей по 11 STR-локусам – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40 [11].

Статистический анализ данных проводили с использованием программ GenAIEx v.6.5 [19], STRUCTURE v.2.3.4 [20], PAST v.3.17 [21] и POPHELPER v.1.0.10 [22]. С использованием GenAIEx v.6.5 был проведен расчет генетических дистанций по методу AMOVA (Analysis of molecular variance) [23]. В программе STRUCTURE v.2.3.4 был рассчитан критерий Q , который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к соответствующему кластеру (субгруппе в пределах группы). С использованием веб-приложения POPHELPER v.1.0.10 произведена графическая интерпретация результатов, полученных в STRUCTURE v.2.3.4. В программе PAST v.3.17 выполнено построение графика главных компонент на основе расчета генетических дистанций по методу AMOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ субпопуляционной структуры исследуемых групп толстолобиков с использованием программы STRUCTURE v.2.3.4 [20] по данным генотипирования 11 STR-локусов, а также наглядная демонстрация полученного результата, выражающаяся в отнесении особей ко всей выборке или конкретной группе и графически представленная в веб-приложении POPHELPER v.1.0.10 [22], приведены на рис. 1.

В результате проведенного моделирования (длительность Burn-in периода – 5000, количество MCMC [Markov chain Monte Carlo] повторов после Burn-in периода – 50000) показано, что имеются два четко выраженных кластера ($K = 2$). В программе STRUCTURE v.2.3.4 по методу J.K. Pritchard для двух групп (“ПТ” и “БТ”) также был проведен расчет критерия Q , который характеризует принадлежность каждой отдельной особи к соответствующей группе (виду). Значение Q , равное 75% или выше, подтверждает членство особи в своем кластере. В табл. 1 представлены результаты анализа, проведенного в STRUCTURE v.2.3.4.

Точность классификации подавляющего большинства особей в пределах группы “Пестрый толстолобик (ПТ)” (60 особей из 63, включенных в данный анализ) варьировала в пределах $99.8 \pm 0.1\%$, аналогичный показатель для особей в пределах группы “Белый толстолобик (БТ)” (65/66) – $99.7 \pm 0.3\%$. В первом кластере “ПТ”

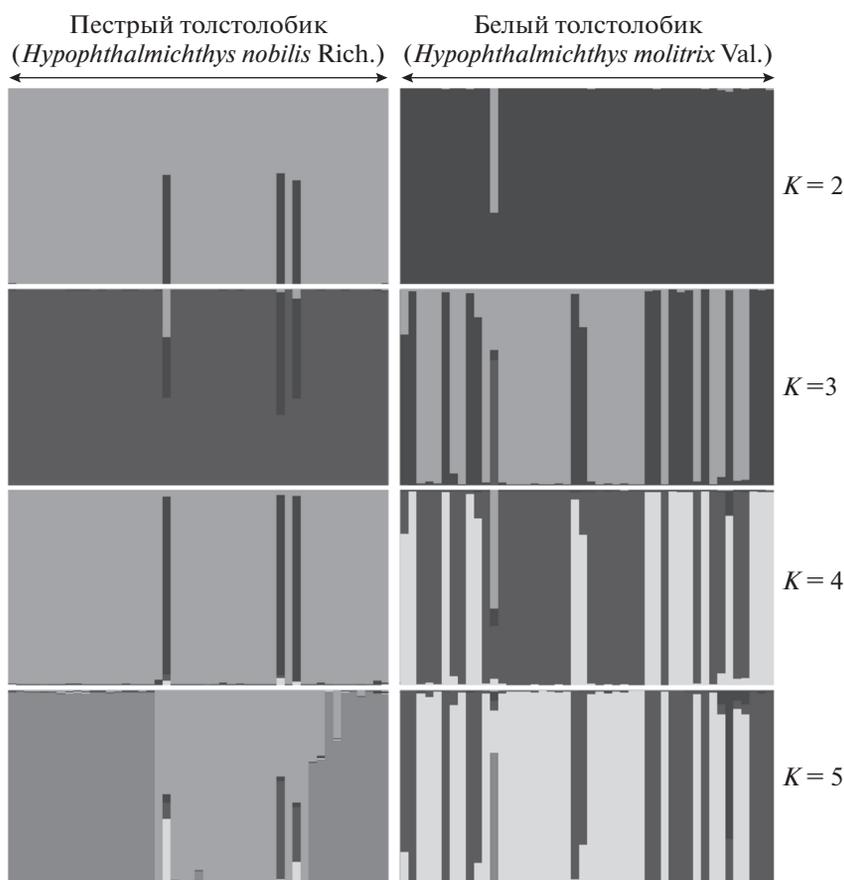


Рис. 1. Результаты анализа генетической структуры исследуемых групп толстолобиков для наиболее вероятного числа кластеров (K) от 3 до 5. Ось X (подпись вверху) – изучаемый вид; ось Y – параметр Q (значение K).

были выявлены три особи, вероятность отнесения которых к группе находилась в пределах 43.0–46.9%; во втором кластере “БТ” была выявлена одна особь, вероятность отнесения которой к группе составила 36.3%. Данные особи были дифференцированы как гибриды между ПТ и БТ. При значении $K=3$ в группе “БТ” представляется возможным выделить уже два субкластера, для группы “ПТ” данное подразделение наблюдается только при $K=5$. Данный факт еще раз подчеркивает полученные нами ранее данные [11] о более выраженном генетическом разнообразии производителей БТ в сравнении с ПТ.

На основании анализа генетических дистанций, рассчитанных по алгоритму AMOVA, был построен график главных компонент (principal component analysis, PCA) – рис. 2. Особи в группе “ПТ” расположены очень компактно, в отличие от особей в группе “БТ”. Данные группы на графике разнесены друг относительно друга и образуют два неперекрывающихся массива, гибридные особи (звездочки) располагаются между группами “ПТ” и “БТ”.

Из 11 STR-локусов, анализируемых в рамках данного исследования, наибольшим потенциалом для решения задачи по дифференциации белого и пестрого толстолобиков обладают те, для которых рассчитанные значения F_{ST} являются максимальными – табл. 2. При расчетах F_{ST} не учитывали те особи, которые были отнесены к гибридам между ПТ и БТ.

Набольшие рассчитанные значения F_{ST} показаны для STR-локусов Hmo15, Hmo33, Hmo40, Hmo25 и Hmo31. Информация об аллельном разнообразии и частоте распространенности конкретных аллелей для перечисленных STR-локусов представлена в табл. 3.

В результате аллельные диапазоны для групп “ПТ” и “БТ” либо не пересекаются (например, для Hmo40), либо представленность мажорных аллелей сильно различается. В частности, для Hmo15 в группе “ПТ” мажорными аллелями были 139 и 141 (суммарная частота распространенности – 100%), для группы “БТ” мажорный аллель – 146 (встречаемость 82.6%). Для Hmo33 в группе “ПТ” мажорный аллель 82 распространен с частотой 93.2% и не представлен в группе “БТ”.

Таблица 1. Точность отнесения особи к одной из двух групп – “ПТ” (пестрый толстолобик) или “БТ” (белый толстолобик)

ID	Кластер		ID	Кластер		ID	Кластер	
	№ 1	№ 2		№ 1	№ 2		№ 1	№ 2
ПТ-01	99.56	0.44	ПТ-44	99.80	0.20	БТ-24	0.20	99.80
ПТ-02	99.80	0.20	ПТ-45	99.80	0.20	БТ-25	0.20	99.80
ПТ-03	99.80	0.20	ПТ-46	43.02	56.98	БТ-26	0.20	99.80
ПТ-04	99.81	0.19	ПТ-47	99.80	0.20	БТ-27	0.20	99.80
ПТ-05	99.80	0.20	ПТ-48	46.87	53.13	БТ-28	0.20	99.80
ПТ-06	99.80	0.20	ПТ-49	99.84	0.16	БТ-29	0.20	99.80
ПТ-07	99.80	0.20	ПТ-50	99.80	0.20	БТ-30	0.21	99.79
ПТ-08	99.61	0.39	ПТ-51	99.74	0.26	БТ-31	0.20	99.80
ПТ-09	99.62	0.38	ПТ-52	99.81	0.19	БТ-32	0.30	99.70
ПТ-10	99.70	0.30	ПТ-53	99.80	0.20	БТ-33	0.20	99.80
ПТ-11	99.78	0.22	ПТ-54	99.71	0.29	БТ-34	0.20	99.80
ПТ-12	99.70	0.30	ПТ-55	99.80	0.20	БТ-35	0.20	99.80
ПТ-13	99.79	0.21	ПТ-56	99.80	0.20	БТ-36	0.21	99.79
ПТ-14	99.80	0.20	ПТ-57	99.80	0.20	БТ-37	0.20	99.80
ПТ-15	99.70	0.30	ПТ-58	99.80	0.20	БТ-38	0.20	99.80
ПТ-16	99.75	0.25	ПТ-59	99.45	0.55	БТ-39	0.20	99.80
ПТ-17	99.80	0.20	ПТ-60	0.20	99.80	БТ-40	0.28	99.72
ПТ-18	99.79	0.21	ПТ-61	0.20	99.80	БТ-41	0.20	99.80
ПТ-19	99.80	0.20	ПТ-62	0.20	99.80	БТ-42	0.20	99.80
ПТ-20	44.18	55.82	ПТ-63	0.20	99.80	БТ-43	0.20	99.80
ПТ-21	99.86	0.14	БТ-01	0.20	99.80	БТ-44	0.20	99.80
ПТ-22	99.82	0.18	БТ-02	0.30	99.70	БТ-45	0.20	99.80
ПТ-23	99.80	0.20	БТ-03	0.20	99.80	БТ-46	0.29	99.71
ПТ-24	99.80	0.20	БТ-04	0.20	99.80	БТ-47	0.20	99.80
ПТ-25	99.80	0.20	БТ-05	0.31	99.69	БТ-48	0.81	99.19
ПТ-26	99.85	0.15	БТ-06	0.21	99.79	БТ-49	1.90	98.10
ПТ-27	99.79	0.21	БТ-07	0.21	99.79	БТ-50	0.20	99.80
ПТ-28	99.83	0.17	БТ-08	0.20	99.80	БТ-51	0.30	99.70
ПТ-29	99.76	0.24	БТ-09	0.002	0.998	БТ-52	0.20	99.80
ПТ-30	99.83	0.17	БТ-10	0.002	0.998	БТ-53	0.20	99.80
ПТ-31	99.81	0.19	БТ-11	0.002	0.998	БТ-54	0.20	99.80
ПТ-32	99.81	0.19	БТ-12	63.72	36.28	БТ-55	0.20	99.80
ПТ-33	99.80	0.20	БТ-13	0.20	99.80	БТ-56	0.21	99.79
ПТ-34	99.80	0.20	БТ-14	0.21	99.79	БТ-57	0.20	99.80
ПТ-35	99.80	0.20	БТ-15	0.20	99.80	БТ-58	0.20	99.80
ПТ-36	99.80	0.20	БТ-16	0.20	99.80	БТ-59	0.20	99.80
ПТ-37	99.80	0.20	БТ-17	0.20	99.80	БТ-60	0.20	99.80
ПТ-38	99.80	0.20	БТ-18	0.21	99.79	БТ-61	0.20	99.80
ПТ-39	99.85	0.15	БТ-19	0.20	99.80	БТ-62	0.20	99.80
ПТ-40	99.70	0.30	БТ-20	0.30	99.70	БТ-63	0.20	99.80
ПТ-41	99.79	0.21	БТ-21	0.20	99.80	БТ-64	0.30	99.70
ПТ-42	99.80	0.20	БТ-22	0.20	99.80	БТ-65	0.20	99.80
ПТ-43	99.70	0.30	БТ-23	0.20	99.80	БТ-66	0.20	99.80

Примечание. Точность кластеризации усреднена по данным 10 итераций, в %; полужирным шрифтом даны гибридные особи ПТ и БТ.

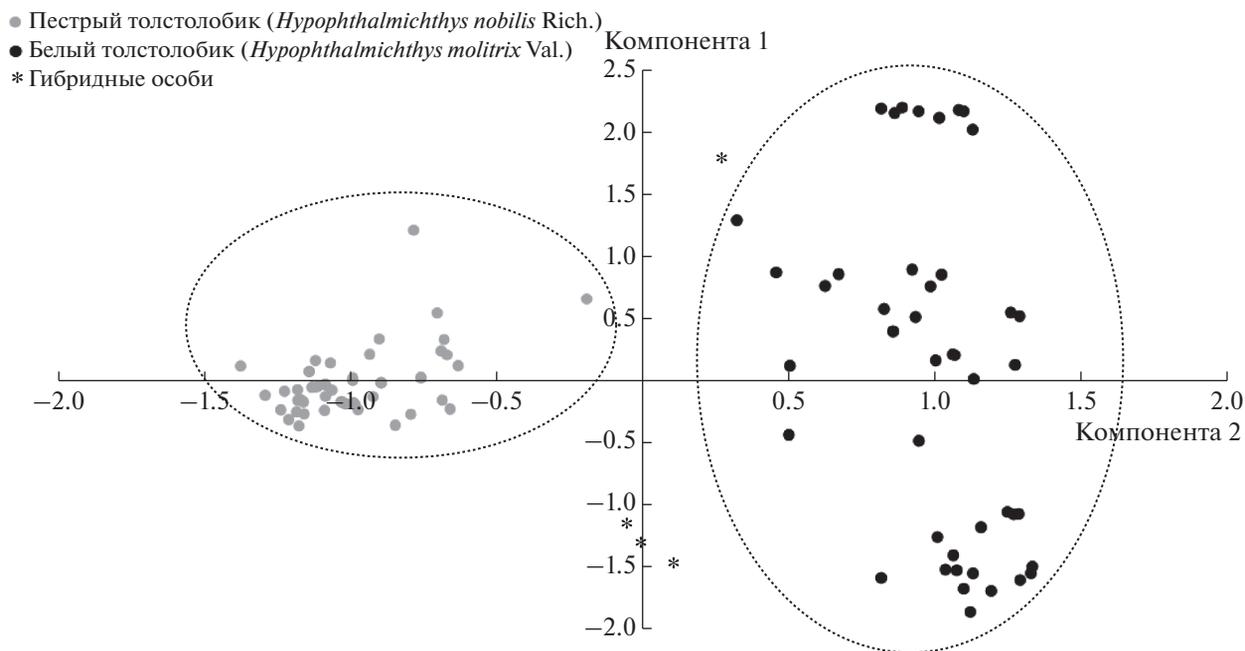


Рис. 2. Результаты анализа главных компонент (по совокупности 11 STR-локусов).

Для STR-локуса Hmo40 в группе “ПТ” наиболее часто встречающимися являлись аллели 246 (41.5%) и 248 (46.3%), в то время как в группе “БТ” мажорный аллель – 210 (58.1%). Для локусов Hmo25 и Hmo31 наблюдается схожая тенденция. В локусе Hmo25 для группы “ПТ” наиболее распространенным являлся аллель 154 (65.9%), для “БТ” – 148 (41.9%) и 150 (32.6%). В локусе Hmo31 для группы “ПТ” наиболее распространен аллель 161 (57.3%), для “БТ” – 139 (38.1%).

На основании полученных данных был проведен повторный анализ субпопуляционной структуры исследуемых выборок толстолобиков с использованием программы STRUCTURE v.2.3.4 на основании результатов генотипирования только пяти из 11 STR-локусов. В результате точность классификации (отнесения к одной из двух групп) оказалась сопоставима с результатами, полученными на 11 STR-локусах. В частности, точность дифференциации ПТ с использованием STR-локусов Hmo15, Hmo33, Hmo40, Hmo25 и Hmo31 составила $99.5 \pm 0.3\%$, БТ – $99.4 \pm 0.8\%$. Также были выявлены и четыре гибридные особи: для ПТ-20 вероятность принадлежности к кластеру “ПТ” составила 48.8%, к кластеру “БТ” – 51.2%; для ПТ-46 – 50.8 и 49.2% соответственно; для ПТ-48 – 54.4 и 45.6%; БТ-12 – 64.6 и 35.4%.

Отдельно необходимо отметить, что в научной литературе представленность информации о частоте встречаемости гибридов между белым и пестрым толстолобиками в аквакультуре или естественных условиях весьма скудна. В исследовании Mia et al. [17] было показано, что среди осо-

бей белого толстолобика, выращиваемых в аквакультуре (коммерческие инкубаторы в различных регионах Бангладеш), процент гибридных особей варьировал в широких пределах – от 2.6% в Ми-менсингхе (Mumensingh) до 18.3% в Борге (Bogra) при среднем значении по стране 8.3% (35/422). Среди особей пестрого толстолобика частота распространенности гибридов была выше – от их

Таблица 2. Дифференцирующий потенциал 11 STR-локусов (результаты анализа locus-by-locus AMOVA)

STR	F_{ST}	p -уровень
Hmo11	0.2214	<0.001
Hmo13	0.1492	<0.001
Hmo15[#]	0.5235	<0.001
Hmo25	0.3356	<0.001
Hmo26	0.1272	0.001
Hmo31	0.2458	<0.001
Hmo33	0.4957	<0.001
Hmo34	0.2147	0.001
Hmo36	0.2134	0.001
Hmo37	0.1592	0.001
Hmo40	0.3500	<0.001

Примечание. F_{ST} – коэффициент инбридинга субпопуляций относительно всей популяции, указывает на редукцию гетерозиготности из-за ограничения потока генов (миграции) и генетического дрейфа между субпопуляциями; полужирным шрифтом выделены пять STR-локусов с максимальными значениями F_{ST} .

Таблица 3. Частота распространенности аллелей среди производителей ПТ и БТ (исключая гибридных особей) для пяти STR-локусов с наибольшим дифференцирующим потенциалом (по результатам F_{ST})

Аллель	Hmo15		Аллель	Hmo33		Аллель	Hmo40		Аллель	Hmo25		Аллель	Hmo31	
	ПТ	БТ												
139	0.537	0.012	76	0.034	—	207	—	0.023	142	—	0.012	131	—	0.107
141	0.463	—	82	0.932	—	210	—	0.581	146	0.011	0.105	133	—	0.036
146	—	0.826	86	—	0.012	212	—	0.012	148	0.011	0.419	135	—	0.060
148	—	0.070	88	—	0.085	215	—	0.140	150	0.057	0.326	139	—	0.381
153	—	0.023	90	—	0.073	217	—	0.233	152	0.034	0.023	141	—	0.071
158	—	0.047	92	—	0.268	220	—	0.012	154	0.659	—	143	—	0.119
160	—	0.023	95	—	0.171	237	0.024	—	156	0.057	—	145	—	0.119
			97	—	0.012	246	0.415	—	159	0.125	0.023	147	—	0.083
			100	—	0.183	248	0.463	—	192	—	0.023	152	0.012	—
			103	—	0.049	250	0.098	—	195	—	0.012	154	0.037	—
			107	0.011	0.037				208	0.023	0.023	156	0.024	—
			109	—	0.012				210	—	0.012	159	0.085	—
			115	0.011	0.085				214	—	0.023	161	0.573	—
			118	—	0.012				246	0.023	—	163	0.220	—
			132	0.011	—							165	0.012	—
												167	0.037	—
												207	—	0.012
												221	—	0.012

полного отсутствия в Комилле (Comilla) до 43.8% в Богре (Bogra) при среднем значении по стране 23.3% (55/236). В рамках проведенного нами настоящего исследования частота гибридов среди особей пестрого толстолобика в маточном стаде составила 4.8% (3/63), среди особей белого толстолобика в маточном стаде — 1.5% (1/66). В целом частота распространенности гибридов в маточных стадах белого и пестрого толстолобиков в Республике Беларусь незначительна. Возможные причины, лежащие в основе различий, заключаются, на наш взгляд, в технологиях выращивания и разведения особей в аквакультурах двух стран. Использование же предложенной схемы по дифференциации данных близкородственных видов в аквакультуре в Республике Беларусь должно свести данный показатель к минимуму или сделать его в перспективе гетерозисных исследований полностью контролируемым.

Для Беларуси растительноядные рыбы — белый (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) и пестрый (*H. nobilis* Rich.) толстолобика — интродуцированные виды. Их используют для зарыбления и мелиорации водоемов, но самоподдерживающиеся популяции не формируются из-за низких температур для начала нереста. Данные виды, будучи растительноядными, представляют исключительно большой интерес для повышения рыбопродуктивности как прудов, так и иных водое-

мов. Особенностью доместикиции этих видов, отличающей их от традиционного объекта рыбоводства — карпа, является способ их воспроизводства. В прудовых условиях эти рыбы не размножаются, и их разведение основывается лишь на физиологическом методе стимуляции созревания с применением гормональных препаратов.

Известно, что в условиях коммерческой аквакультуры с довольно высокой частотой происходит скрещивание между белым и пестрым толстолобиками, а дальнейшая межвидовая гибридизация и последующая интрогрессия между этими видами могут иметь негативные последствия для маточных и ремонтных стад.

В данном исследовании была дана оценка дифференцирующего потенциала 11 STR-локусов для решения задачи по идентификации особей белого и пестрого толстолобиков, а также для выявления гибридных особей между данными видами.

Анализ субпопуляционной структуры исследуемых двух групп толстолобиков позволил сделать заключение, что на основании результатов генотипирования по 11 STR-локусам точность классификации особей пестрого толстолобика составляет $99.8 \pm 0.1\%$, особей белого толстолобика — $99.7 \pm 0.3\%$. Точность классификации сохраняется и при генотипировании только пяти STR-локусов — Hmo15, Hmo33, Hmo40, Hmo25 и

Нто31, дифференцирующий потенциал которых по данным F_{ST} был наибольшим и варьировал в пределах 0.2458–0.5235. Предложенная нами схема по дифференциации особей белого и пестрого толстолобиков с использованием пяти STR-локусов позволит также выявлять гибридные особи между данными видами растительноядных видов рыб, что может быть использовано в качестве экспресс-теста в селекционных и воспроизводительных программах.

На основании полученных результатов в лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси (Минск, Республика Беларусь) совместно с сотрудниками Института рыбного хозяйства (Минск, Республика Беларусь) разработана и используется технология генетической идентификации растительноядных рыб (белого толстолобика, пестрого толстолобика и их гибридов), которая позволит повысить продуктивность за счет реализации эффективных селекционных приемов, а также за счет контроля формирования межвидовых гибридов.

Работа выполнена в рамках мероприятия 21ИБ “Разработать и внедрить технологию генетической идентификации растительноядных и лососевых видов рыб” подпрограммы I “Инновационные биотехнологии – 2020” ГП “Наукоёмкие технологии и техника” на 2016–2020 гг., Республика Беларусь.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеец В.Ю. Перспективы развития рыбоводства в Беларуси // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. аграрных навук. 2013. № 2. С. 102–109.
2. Агеец В.Ю. Экологические проблемы рыбоводства в Республике Беларусь и пути их решения // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. аграрных навук. 2015. № 2. С. 95–101.
3. Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics // Aquaculture. 2006. V. 255. № 1–4. P. 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031>
4. Gheyas A.A., Cairney M., Gilmour A.E. et al. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 3. P. 656–659. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01288.x>
5. Feng X., Yu X., Fu B. et al. Development of 159 transcript-associated microsatellite markers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) // Conserv. Genet. Res. 2014. V. 6. № 1. P. 111–113. <https://doi.org/10.1007/s12686-013-0017-3>
6. Wang C.Z., Liang H.W., Zou G.W. et al. Genetic variation analysis of two silver carp populations in the middle and upper Yangtze River by microsatellite // Yi Chuan. 2008. V. 30. № 10. P. 1341–1348. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1005.2008.01341>
7. Liao M., Yang G., Wang X. et al. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. № 1. P. 95–99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01542.x>
8. Guo W., Xiaomu Yu, Tong J. et al. Development of 134 novel polynucleotide-repeat microsatellite markers in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) // Conserv. Genet. Res. 2012. V. 5. № 2. P. 525–528. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9843-y>
9. Cheng L., Liu L., Yu X. et al. Sixteen polymorphic microsatellites in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and cross-amplification in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) // Mol. Ecol. Res. 2008. V. 8. № 3. P. 656–658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02037.x>
10. Nazish N., Abbas K., Abdullah S. et al. Microsatellite diversity and population structure of *Hypophthalmichthys molitrix* in hatchery populations of Punjab // Turkish J. Fisheries and Aquatic Sci. 2018. V. 18. P. 1113–1122. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_9_10
11. Носова А.Ю., Купень В.Н., Царь А.И. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов у белого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis* Rich.) толстолобиков, выращиваемых в аквакультуре в Республике Беларусь // Докл. НАН Беларуси. 2019. Т. 63. № 1. С. 79–86.
12. Wang J., Yang G., Zhou G. Quantitative trait loci for morphometric body measurements of the hybrids of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*H. nobilis*) // Acta Biol. Hungarica. 2013. V. 64. № 2. P. 169–183. <https://doi.org/10.1556/ABiol.64.2013.2.4>
13. Li Y., Ludwig A., Pengcorresponding Z. Geographical differentiation of the *Euchiloglanis* fish complex (Teleostei: Siluriformes) in the Hengdian Mountain Region, China: Phylogeographic evidence of altered drainage patterns // Ecol. Evol. 2017. V. 7. № 3. P. 928–940. <https://doi.org/10.1002/ece3.2715>
14. Christopher G. Genetic variation and differentiation in African catfish, *Clarias gariepinus*, assessed by heterologous microsatellite DNA // Ind. J. Biotechnology. 2015. V. 14. № 3. P. 388–393. <https://doi.org/10.1002/ece3.2715>
15. Deniskova T.E., Sermyagin A.A., Bagirov V.A. et al. Comparative analysis of the effectiveness of STR and SNP markers for intraspecific and interspecific differentiation of the genus *ovis* // Genetika. 2016. V. 52. № 1. P. 90–96. <https://doi.org/10.1134/S1022795416010026>

16. *Conyers C.M., Allnutt T.R., Hird H.J. et al.* Development of a microsatellite-based method for the differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) from domestic pig breeds (*Sus scrofa domestica*) in food // *J. Agricultural and Food Chemistry*. 2012. V. 60. № 13. P. 3341–3347. <https://doi.org/10.1021/jf205109b>
17. *Mia M.Y., Taggart J.B., Gilmour A.E. et al.* Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci // *Aquaculture*. 2005. V. 247. № 1–4. P. 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.018>
18. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
19. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
20. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
21. *Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.* Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
22. *Francis R.M.* Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure // *Mol. Ecol. Resour.* 2017. V. 17. № 1. P. 27–32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
23. *Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics*. 1992. V. 131. № 2. P. 479–491.

Differentiation of Hybrid Offspring of Silver (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and Bighead (*H. nobilis* Rich.) Carps Based on Microsatellite Loci Analysis

A. Yu. Nosova^a, V. N. Kipen^{a, *}, A. I. Tsar^a, and V. A. Lemesh^{a, **}

^a*Institute of Genetics and Cytology of The National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

*e-mail: v.kipen@igc.by

**e-mail: v.lemesh@igc.by

This study shows the potential role of 11 microsatellite loci (Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo34, Hmo36, Hmo37, Hmo40) to differentiate between silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis* Rich.) using molecular genetic analysis. The largest calculated F_{ST} values are shown for the STR loci Hmo15 (0.5235), Hmo33 (0.4957), Hmo40 (0.3500), Hmo25 (0.3365) and Hmo31 (0.2458). The accuracy of classification bighead carp using these microsatellite loci was $99.5 \pm 0.3\%$, silver carp – $99.4 \pm 0.8\%$. With the use of five STR-loci, a scheme was proposed for identifying hybrid individuals between silver carp and bighead carp grown in aquaculture in the territory of the Republic of Belarus. This approach can be used as a rapid test in breeding and reproductive programs for these species of herbivorous fish.

Keywords: silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* Rich., microsatellite loci, short tandem repeat (STR), allele, F_{ST} fixation index, differentiation, hybrids.