

УДК 575:639.3

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛОГО И ПЕСТРОГО ТОЛСТОЛОБИКОВ ГПСРП «ЛИМАНСКОЕ» ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Борисенко Н.А., Нагорнюк Т.А.

*Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук Украины,
Киев, e-mail: b_natalia@i.ua*

Проанализированы особенности генетической структуры белого и пестрого толстолобиков при использовании 6-ти генетико-биохимических маркеров – *TF, Pralb, EST, MDH, ME, CA*. У обоих видов толстолобиков locus *TF* имеет 2–5 электрофоретических компонентов – *ТfA, B, C, D, E*. Выявлены сезонные отличия по частоте аллельных вариантов у групп белого толстолобика по локусам *Pralb* и *EST*, у пестрого – по локусу *Pralb*. Обнаружена специфичность распределения аллельных вариантов локуса *ME*, поскольку у исследуемых видов толстолобика летом и осенью значительно преобладала частота аллеля с низкой молекулярной массой. Наблюдалось преобладание фактического уровня гетерозиготности над ожидаемым по локусам *CA* (летом и осенью), *EST* (осенью) у белого толстолобика и локусами *Pralb* (летом), *EST* (летом и осенью) у пестрого толстолобика. Выявленный уровень средней гетерозиготности на locus составил 57,8% (летом) и 65,3% (осенью) у белого, а также 64,5% (летом) и 60,5% (осенью) у пестрого толстолобика.

Ключевые слова: белый толстолобик, пестрый толстолобик, генетико-биохимические маркеры, генетическая структура, аллели, генотип, гетерозиготность

VARIABILITY OF GENETIC STRUCTURE OF SILVER AND BIGHEAD CARPS OF SPAFF «LIMANSKOE» OF KHARKIV REGION

Borisenko N.A., Nagornyuk T.A.

*Institute of Fisheries of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
Kyiv, e-mail: b_natalia@i.ua*

The analysis of genetic structure of silver and bighead carps by the six genetic-biochemical markers – *TF, Pralb, EST, MDH, ME, CA* has been carried out. The *TF* locus of two views of carps has 2–5 electrophoretic components – *TfA, B, C, D, E*. It has been found seasonal differences by frequency of allelic variants in groups of silver carps by loci of *Pralb* and *EST* and locus of *Pralb* in bighead carps. It has been find out specificity allocation of allelic variants of locus *ME*, as far as the investigated species of carps were characterized more higher level of allele frequency with low molecular mass in summer and autumn. Predominance of observed level of heterozygosity comparatively with expected by the loci *CA* (summer and autumn), *EST* (autumn) of silver carp and loci *Pralb* (summer), *EST* (summer and autumn) of bighead carp was observed. The level of average heterozygosity per locus of silver carp was 57,8% (summer) and 65,3% (autumn) and 64,5% (summer), 60,5% (autumn) of bighead carp.

Keywords: silver carp, bighead carp, genetic-biochemical markers, genetic structure, alleles, genotype, heterozygosity

В прудовых рыбоводных хозяйствах Украины практика формирования племенного материала белого и пестрого толстолобиков, когда их маточные стада происходят от ограниченного количества самок, во многих случаях приводила к получению гибридного потомства, повышению уровня инбридинга и сужению изменчивости популяционной генетической структуры. В связи с этим важным является необходимость увеличения гетерогенности племенных стад и повышение уровня жизнестойкости рыб [8].

Поэтому при формировании племенных стад генетически чистого материала белого и пестрого толстолобиков важным является постоянный их генетический контроль [7].

В генетических и селекционных исследованиях перспективным является использование биохимической изменчивости. Анализ полиморфизма белков может дать важную информацию о гетерогенности исходного материала, что позволит спланировать селекционно-племенную работу.

Изучение биохимических маркеров позволяет оценивать генетическую структуру популяций, следить за ее изменениями при формировании маточных стад рыб, позволяет определять их генетическую разнокачественность [6].

Целью нашего исследования было проанализировать особенности изменчивости генетической структуры и уровня гетерогенности при использовании генетико-биохимических маркеров у двух видов толстолобиков, выловленных в разные сезоны (лето, осень) в условиях ГПСРП «Лиманское» Харьковской обл.

Материал и методы исследования

Отбор образцов крови проводили осенью и летом у групп толстолобиков, которые выращиваются в ГПСРП «Лиманское» Харьковской обл. Кровь отбирали у живых особей из хвостовой вены в пластиковые пробирки с гепарином. Кровь центрифугировали при 3 тыс. оборотов 10 мин и отбирали плазму в отдельные пробирки. Образцы плазмы и эритроцитов хранили при –20°C.

Выполнен анализ генетической структуры белого (*Hypophthalmichthys molitrix*) и пестрого (*Aristichthys nobilis*) толстолобиков по шести генетико-биохимическим маркерам – локусам трансферрина (*TF*), преальбумина (*Pralb*), эстеразы (*EST*, КФ 3.1.1.1), малатдегидрогеназы (*MDH*, КФ 1.1.1.37), малик энзима (*ME*, КФ 1.1.1.40) и карбоангидразы (*CA*, КФ 4.2.1.1).

Исследования проводились с использованием методов вертикального полиакриламидного и горизонтального крахмального электрофорезов [2, 9] с собственными модификациями с последующим гистохимическим окрашиванием [1] и генотипированием согласно рекомендациям авторов [3–5]. Статистическую обработку полученных результатов вы-

полняли с использованием компьютерной программы «Biosys-1» [10].

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенный анализ генетической структуры групп белого и пестрого толстолобиков, выловленных осенью и летом, дал возможность выявить отличия по частоте аллелей полиморфных белковых и ферментных локусов, особенности распределения которых представлены в табл. 1.

Таблица 1

Частота аллелей по генетико-биохимическим маркерам у толстолобиков

Локус	Аллель	Частота аллелей			
		белый толстолобик		пестрый толстолобик	
		лето	осень	лето	осень
Pralb	A	0,317	0,456	0,533	0,650
	B	0,683	0,544	0,467	0,350
EST	F	0,569	0,618	0,534	0,517
	S	0,431	0,382	0,466	0,483
MDH	F	0,583	0,571	0,567	0,533
	S	0,417	0,429	0,433	0,467
ME	F	0,667	0,614	0,633	0,600
	S	0,333	0,386	0,367	0,400
CA	F	0,483	0,471	0,483	0,517
	S	0,517	0,529	0,517	0,483

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показал что сезонные отличия по частоте аллельных вариантов наблюдали у групп белого толстолобика по локусам *Pralb* и *EST*. У белого толстолобика, выловленного летом, преобладает частота аллельного варианта *Pralb* B (0,683), сравнительно с частотой *Pralb* A (0,317).

У выловленной осенью группы белого толстолобика таких отличий по частоте аллелей *Pralb* A и B не выявлено. По локусу *EST* у белого толстолобика осенью преобладает частота аллеля с низкой молекулярной массой *Est* F (0,618), в отличие от аллеля *Est* S (0,382) и по сравнению с группой летнего периода, у которой частота обоих аллельных вариантов локуса *EST* заметно не отличалась.

У пестрого толстолобика сезонные отличия выявлены по локусу *Pralb*. Так, у выловленной осенью группы частота *Pralb* A (0,650) значительно преобладает над частотой *Pralb* B (0,350). У пестрого толстолобика, выловленного летом, отличий между частотой аллельных вариантов локуса *Pralb* не выявлено (см. табл. 1).

Из приведенных данных также видно, что наблюдалась специфика распределе-

ния аллелей локуса *ME*. Так, у групп белого и пестрого толстолобиков, как в летний, так и в осенний периоды, значительно чаще встречался аллель *Me* F, по сравнению с аллелем *Me* S.

Проведенный анализ показал, что у толстолобиков, выловленных в разные сезоны, выявлены отличия по распределению фактических и ожидаемых генотипов исследуемых локусов (табл. 2, 3).

Приведенные в таблице данные показывают, что у белого толстолобика, выловленного осенью, избыток гетерозиготных особей FS наблюдался по локусам *CA* ($\chi^2 = 6,140$; $P < 0,05$), *EST* ($\chi^2 = 12,456$; $P < 0,001$) и *ME* ($\chi^2 = 4,867$; $P < 0,05$).

У выловленных летом белых толстолобиков неуравновешенное состояние генетической структуры из-за избытка гетерозигот наблюдалось только по локусу *CA* ($\chi^2 = 4,439$; $P < 0,05$).

У пестрого толстолобика, выловленного летом, достоверный избыток гетерозигот обнаружен по локусам *Pralb* ($\chi^2 = 6,249$; $P < 0,05$) и *EST* ($\chi^2 = 9,636$; $P < 0,01$), а в группе толстолобика, выловленного осенью, такой избыток присутствует только по локусу *EST* ($\chi^2 = 7,297$; $P < 0,01$).

Таблица 2

Распределение генотипов по локусам у толстолобиков в летний период

Локусы	Генотипы	Белый				Пестрый			
		G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P	G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P
Pralb	AA	3	2,9	0,007	> 0,05	5	8,4	6,249	< 0,05
	AB	13	13,2			22	15,2		
	BB	14	13,9			3	6,4		
EST	FF	7	9,3	2,942	> 0,05	4	8,2	9,636	< 0,01
	FS	19	14,5			23	14,7		
	SS	3	5,3			2	6,2		
MDH	FF	10	10,1	0,004	> 0,05	9	9,5	0,143	> 0,05
	FS	15	14,8			16	14,9		
	SS	5	5,1			5	5,5		
ME	FF	11	13,2	3,358	> 0,05	10	11,9	2,280	> 0,05
	FS	18	13,6			18	14,2		
	SS	1	3,2			2	3,9		
CA	FF	4	6,9	4,439	< 0,05	6	6,9	0,415	> 0,05
	FS	21	15,2			17	15,2		
	SS	5	7,9			7	7,9		

Примечание. G_{obs} – фактические генотипы; G_{exp} – ожидаемые генотипы.

Таблица 3

Распределение генотипов по локусам у толстолобиков в осенний период

Локусы	Генотипы	Белый				Пестрый			
		G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P	G_{obs}	G_{exp}	χ^2	P
Pralb	AA	7	6,9	0,002	> 0,05	11	12,6	1,577	> 0,05
	AB	17	17,1			17	13,9		
	BB	10	9,9			2	3,6		
EST	FF	8	12,9	12,456	< 0,001	4	7,6	7,297	< 0,01
	FS	26	16,3			22	14,7		
	SS	0	4,9			3	6,6		
MDH	FF	9	11,3	2,533	> 0,05	8	8,4	0,089	> 0,05
	FS	22	17,4			16	15,2		
	SS	4	6,3			6	6,4		
ME	FF	10	13,1	4,867	< 0,05	9	10,7	1,635	> 0,05
	FS	23	16,8			18	14,6		
	SS	2	5,1			3	4,7		
CA	FF	4	7,6	6,140	< 0,05	7	7,9	0,415	> 0,05
	FS	25	17,7			17	15,2		
	SS	6	9,7			6	6,9		

Примечание. G_{obs} – фактические генотипы; G_{exp} – ожидаемые генотипы.

По литературным данным у пестрого толстолобика locus трансферрина кодируется пятью кодоминантными аллелями (A, B, C, D и E) [4]. У исследуемых групп толстолобиков locus *TF* распределялся на 2–5 электрофоретических компонентов – *Tf* A, B, C, D, E. У белого толстолобика летом выявлено четыре типа фракционного состава трансферрина – один четырехкомпонентный (*Tf* ABCD –

10%), два трехкомпонентных (*Tf* ABC – 10%, *Tf* BCD – 30%) и один двухкомпонентный (*Tf* BC – 50%). У белого толстолобика осенью обнаружено восемь компонентов локуса *TF* – три двухкомпонентных (*Tf* AB – 2,9%, *Tf* AD – 2,9%, *Tf* CD – 28,5%), три трехкомпонентных (*Tf* ABC – 5,7%, *Tf* BCD – 40%, *Tf* CDE – 8,6%) и два четырехкомпонентных (*Tf* ABCD – 8,6%, *Tf* BCDE – 2,9%).

У пестрого толстолобика летом локус *TF* представлен 8 типами электрофоретических фракций – один четырехкомпонентный (*Tf* ABCD – 3,3%), три трехкомпонентных (*Tf* ABC – 10%, *Tf* ABD – 13,3%, *Tf* BCD – 33,3%) и четыре двухкомпонентных (*Tf* AB – 6,7%, *Tf* AC – 3,3%, *Tf* BC – 26,7%, *Tf* BD – 3,3%). У пестрого толстолобика осенью локус *TF* представлен 6-ю типами электрофоретических фракций – один пятикомпонентный (*Tf* ABCDE – 3,3%), один четырехкомпонентный (*Tf* BCDE – 6,7%), два трехкомпонентных (*Tf* BCD – 3,3%, *Tf* CDE – 26,7%) и два двухкомпонентных (*Tf* CD – 3,3%, *Tf* DE – 56,7%).

По исследованным генетико-биохимическим маркерам достаточно высокий уро-

вень гетерозиготности выявлен у белого толстолобика по локусам *CA* (70 и 71,4% летом и осенью, соответственно) и *EST* (76,5% осенью). У пестрого толстолобика этот показатель был высоким по локусам *EST* (79,3 и 75,9%, летом и осенью соответственно) и *Pralb* (73,3% летом). У исследуемых групп толстолобиков фактический уровень гетерозиготности по указанным выше локусам достоверно преобладал над ожидаемым (табл. 4).

Несмотря на достаточно высокий фактический уровень гетерозиготности по отдельным локусам, выявленный уровень средней гетерозиготности на локус заметно не отличался от теоретически рассчитанного у исследуемых видов толстолобиков.

Таблица 4

Уровень средней гетерозиготности по генетико-биохимическим маркерам у толстолобиков

Сезон	Локус H	EST	Pralb	MDH	ME	CA	H _{средняя}
Белый толстолобик							
Лето	H _{obs}	0,655	0,433	0,500	0,600	0,700	0,578 ± 0,049
	H _{exp}	0,499	0,440	0,494	0,452	0,508	0,479 ± 0,014
Осень	H _{obs}	0,765	0,500	0,629	0,657	0,714	0,653 ± 0,045
	H _{exp}	0,479	0,504	0,497	0,481	0,506	0,493 ± 0,006
Пестрый толстолобик							
Лето	H _{obs}	0,793	0,733	0,533	0,600	0,567	0,645 ± 0,05
	H _{exp}	0,506	0,506	0,499	0,472	0,508	0,498 ± 0,007
Осень	H _{obs}	0,759	0,567	0,533	0,600	0,567	0,605 ± 0,04
	H _{exp}	0,508	0,463	0,506	0,488	0,508	0,495 ± 0,009

Примечание. H_{obs} – фактический уровень гетерозиготности; H_{exp} – ожидаемый уровень гетерозиготности.

Заключение

Выполнен анализ генетической структуры групп белого и пестрого толстолобиков, выловленных в разные сезоны, по полиморфным генетико-биохимическим маркерам: *TF*, *Pralb*, *EST*, *MDH*, *ME* и *CA*. У толстолобиков локус *TF* на электрофореграммах представлен 2–5 вариантами – *Tf* A, B, C, D, E. Наблюдалась специфика распределения аллелей локуса *ME*: у двух видов толстолобиков летом и осенью преобладала частота аллеля с низкой молекулярной массой *Me F*, сравнительно с *Me S*. По частоте

аллельных вариантов наблюдали сезонные отличия у групп белого толстолобика по локусам *Pralb* и *EST*, а у пестрого – только по локусу *Pralb*.

Несмотря на выявленный достаточно высокий уровень гетерозиготности по отдельным локусам, фактический уровень средней гетерозиготности на локус у видов заметно не отличался от ожидаемого и составил 57,8% (летом) и 65,3% (осенью) у белого, а также 64,5% (летом) и 60,5% (осенью) у пестрого толстолобиков, что свидетельствует об уравновешенном состоянии генетической структуры исследуемых популяций.

Список литературы

1. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
2. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. – К.: Урожай, 1993. – 528 с.
3. Демкина Н.В., Новикова Е.В., Демкин В.А. Результаты использования биохимических маркеров в селекции карповых рыб – опыт ВНИИПРХ // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб: тезисы докл. междунар. конф. (10–12 сент. 2008 г.). – СПб., 2008. – С. 58–59.
4. Карнаухов Г.И., Василиади В.Д. Трансферрины белого и пестрого толстолобиков // Проблемы воспроизводства растительноядных рыб, их роль в аквакультуре: материалы междунар. научно-практ. конф. (Адлер, 27-30 сент. 2000 г.). – Краснодар, 2000. – С. 22–23.
5. Карнаухов Г.И., Василиади В.Д. Альбумины белого и пестрого толстолобиков // Проблемы воспроизводства растительноядных рыб, их роль в аквакультуре: материалы междунар. научно-практ. конф. (Адлер, 27-30 сент. 2000 г.). – Краснодар, 2000. – С. 23–24.
6. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. – Л.: Наука, 1987. – 520 с.
7. Организация селекционно-племенной работы в рыбоводстве. – К.: «Рыбка моя», 2006. – 352 с.
8. Фермерское рыбоводство. – К.: Герб, 2008. – 560 с.
9. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – Vol. 121. – P. 404–408.
10. Swofford D.L., Selander R.B. Biosys-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Heredity. – 1981. – Vol. 72. – P. 281–283.

References

1. Korochkin L.I., Serov O.L., Pudovnik A.I. [et al.] *Genetika izofermentov* [Genetics of isoenzymes]. Moscow, Nauka, 1977. 275 p.
2. Glazko V.I. Sozinov I.A. *Genetika izofermentov zhivotnyh i rastenij* [Genetics of isoenzymes of animals and plants]. Kyiv, Urozhaj, 1993. 528 p.
3. Demkina N.V., Novikova E.V., Demkin V.A. Rezul'taty ispol'zovaniya biohimicheskikh markerov v selekcii karpovyh ryb – opyt VNIIPRH. Tezisy dokl. mezhdunar. konf. «Genetika, selekcija, gibridizacija, plemennoe delo i vosproizvodstvo ryb»

(The results of using biochemical markers in selection of carp fish – experience VNIIPRH. Abstracts of report of the International conf. «Genetics, selection, hybridization, breeding and reprodnction of fish»). St. Peterburg, 2008, pp. 58–59.

4. Karnauhov G.I., Vasiliadi V.D. Transferriny belogo i pestrogo tolstolobikov. *Problemy vosproizvodstva rastitel'nojadnyh ryb, ih rol' v akvakul'ture* (Transferrines of silver carp and bighead carp. Problems of reproduction of herbivorous fish, their role in aquaculture. Materials of International Scientific and Practical Conf.) Krasnodar, 2000, pp. 22–23.
5. Karnauhov G.I., Vasiliadi V.D. Al'buminy belogo i pestrogo tolstolobikov. *Problemy vosproizvodstva rastitel'nojadnyh ryb, ih rol' v akvakul'ture* (Albumin silver carp and bighead carp. Problems of reproduction of herbivorous fish, their role in aquaculture. Materials of International Scientific and Practical Conf.) Krasnodar, 2000, pp. 23–24.
6. Kirpichnikov V.S. Genetika i selekcija ryb [Genetics and selection of fish]. Leningrad, Nauka, 1987. 520 p.
7. Hrynzhivs'kyj M.V., Sherman I.M., Hrytsynyak I.I. [et al.]. Orhanizatsiya selektsiyno-pleminnoyi roboty v rybnnytstvi [Organization of selection-breeding work in fisheries]. Kyiv, Rybka moja, 2006. 352 p.
8. Hrytsynyak I. I., Hrynzhivs'kyj M. V., Tretyak O. M. [et al.]. *Fermers'ke rybnnytstvo* [Fish farming]. Kyiv, Herb, 2008. 560 p.
9. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. Vol. 121. pp. 404–408.
10. Swofford D.L., Selander R.B. Biosys-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Heredity. 1981. Vol. 72. pp. 281–283.

Рецензенты:

Третьяк А.М., д.с.-х.н., старший научный сотрудник, заместитель директора по научной работе, Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук Украины, г. Киев;
 Бех В.В., д.с.-х.н., старший научный сотрудник, зав. отдела селекции рыб, Институт рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук Украины, г. Киев.
 Работа поступила в редакцию 01.04.2014.