

УДК 575.15; 639.3.032:639.371.5

Крась С.І., аспірант; (s_kras@inbox.ru)**Тарасюк С.І.**, чл.-кор. УААН, д-р с.-г. наук (tarasjuk@ukr.net)**Маріуца А. Е.** кандидат біол. наук[©]

Інститут рибного господарства НААН України

**ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДА АМУРСЬКОГО САЗАНА
(*Cyprinus carpio haematopterus*) РИБОГОСПОДАРСТВА «ЛІСНЕВИЧІ»**

Проаналізовано генетичну структуру популяції сазана амурського за п'ятьма генетико-біохімічними системами. Встановлено відхилення фактичного розподілу частот генотипів від очікуваного за локусом трансферину. Виявлено відмінності між фактичною гетерозиготністю за всіма досліджуваними локусами, окрім естерази. Дійшли висновку про те, що оцінка поліморфізму за цими генетико-біохімічними системами може бути складовою для об'єктивної оцінки генетичної структури досліджуваного плем'ядра сазана амурського в майбутньому.

Ключові слова: амурський сазан, молекулярно-генетичні маркери, генетична структура, гетерозиготність, трансферин, естераза, альбумін.

Вступ. Ефективне ведення промислового ставового рибництва на території України передбачає використання низки селекційно-племінних методів по підвищенню продуктивності вирощуваної риби. Оскільки основним об'єктом промислового рибництва є короп, то для підвищення продуктивності його вирощування в рибній галузі на рибогосподарських підприємствах використовується метод промислової гібридизації амурського сазана (*Cyprinus carpio haematopterus*) з коропом з метою одержання гібридів першого покоління, які характеризуються значним проявом ефекту гетерозису [1] і є більш стійкими до захворювань та впливу негативних факторів навколишнього середовища. Для забезпечення ставового рибництва чистопородним високопродуктивним племінним матеріалом амурського сазана потрібно проводити моніторинг генетичної структури племінних стад з метою дослідження її стану та виявлення змін у ній, який надасть змогу в подальшому проводити ефективну роботу із збереження і консолідації. Незважаючи на велику кількість методів, які дозволяють маркувати мінливість генетичного матеріалу, до цього часу найбільш доступним, інформативним та надійним залишається метод аналізу генетично детермінованого поліморфізму білків з відомими біохімічними функціями.

Тому метою нашої роботи було дослідження генетичної структури племінного стада амурського сазана рибогосподарства «Лісневичі» з використанням генетико-біохімічних маркерів.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень була плазма і еритроцити крові, відібраної з хвостової вени 29 плідників амурських сазанів племядра

рибогосподарства «Лісневичі». В якості консерванту використовували гепарин з розрахунку 25 МО на 1 мл крові. Відібрану кров фракціонували центрифугуванням впродовж 10 хвилин та 3,5 тис. об/хв. Отримані фракції крові – плазму та еритроцити - фасували у пробірки типу Епендорф, заморожували і зберігали при температурі -18°C до проведення досліджень. Методом електрофорезу в поліакриламідному та крохмальному гелях здійснювали розподіл білків із наступним гістохімічним пофарбуванням з власними модифікаціями [2, 3, 4]. Як молекулярно-біохімічні маркери для характеристики генетичної структури популяції використовували розподіл частот алелей і генотипів локусів, що кодують наступні білки і ферменти: трансферин (Tf), альбумін (Alb), естераза (Est) (К.Ф.3.1.1.1.), супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1) та каталаза (CAT) (КФ 1.11.1.6).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "BIOSYS-1"[5].

Результати дослідження. У досліджуваній популяції нами було виявлено поліморфізм по всіх досліджуваних генетико-біохімічних системах. Найбільшу кількість алельних варіантів містив локус залізовв'язуючого білку плазми крові трансферину, основною функцією якого є транспорт іонів заліза від еритроцитів до клітин [6], зокрема, еритробластів червоного кісткового мозку де відбувається синтез гемоглобіну. У багатьох видів риб трансферин кодується одним геном [1]. Високий рівень поліморфізму цього білка спричинений широким спектром алелей (від 2 до 13) [7].

У досліджуваній популяції сазана амурського нами виявлено п'ять алельних форм за локусом трансферину: TfA, TfB, TfC₁, TfC₂, TfD. Найбільшою була частота алельного варіанту TfA (табл.1), яка становила 0,276, найменшою – TfD (0,138). Аналіз генотипів показав, що із 15 можливих наявні лише 12, серед яких генотип AC₁ зустрічався з найбільшою частотою, тоді як генотипи BB, C₁D, C₂D були відсутні. За локусом трансферину нами встановлено статистично достовірну відмінність фактичного розподілу кількості генотипів по відношенню до очікуваної за законом Харді-Вайнберга у досліджуваній популяції сазана. Рівень фактичної гетерозиготності (табл.1) був вищий за очікуваний на 4%.

Естераза плазми крові є ферментом класу гідролаз, який каталізує реакції розщеплення ефірних зв'язків карбонових кислот з нафтолом. У риб естерази є продуктами декількох локусів і по багатьох із них спостерігається індивідуальна мінливість [8]. У досліджуваній групі сазана виявлено два алельні варіанти, фракції яких різняться за рухливістю у поліакриламідному гелі: EstF – більш рухливі та EstS – більш повільні. Частота алельного варіанту EstF становила 0,706, а EstS – 0,293 (табл.1).

Таблиця 1

**Розподіл алельних частот, очікуваних і фактичних генотипів у
популяції сазана амурського (*Cyprinus carpio haematopterus*) за
досліджуваними локусами**

Локус	Алелі	Частота	Генотипи	Кількість генотипів		χ^2
				наявна	очікувана	
Tf	A	0,276	AA	1	2,2	17,38*
			AB	4	3,3	
			AC ₁	6	3,05	
			AC ₂	3	3,05	
	B	0,207	AD	1	2,2	
			BB	-	0,043	
			BC ₁	1	0,079	
			BC ₂	2	0,079	
	C ₁	0,190	BD	5	0,057	
			C ₁ C ₁	1	0,036	
	C ₂	0,190	C ₁ C ₂	2	0,072	
			C ₁ D	-	0,052	
	D	0,138	C ₂ C ₂	2	0,036	
C ₂ D			-	0,052		
DD			1	0,019		
				H₀ = 0,827	H_s = 0,791	
Est	F	0,706	FF	15	14,5	0,2
	S	0,293	FS	11	12	
			SS	3	2,49	
				H₀ = 0,379	H_s = 0,414	
Alb	A	0,310	AA	1	2,78	2,4
			AB	16	12,41	
	B	0,690	BB	12	13,8	
				H₀ = 0,550	H_s = 0,428	
SOD	F	0,603	FF	15	10,55	0,19
	S	0,396	FS	10	13,85	
			SS	4	4,5	
				H₀ = 0,517	H_s = 0,478	
CAT	F	0,310	AA	1	2,78	2,89
			AB	16	12,41	
	S	0,690	BB	12	13,8	
				H₀ = 0,655	H_s = 0,498	
He = 0,586						
S. E. = 0,091						

Примітка. Тут і далі H₀ – фактична гетерозиготність; H_s – очікувана гетерозиготність; He – середня гетерозиготність на локус; * - достовірність відмінності фактичної кількості генотипів від очікуваної за критерієм Пірсона при P<0,05.

У даній популяції виявили три можливі генотипи зі значною перевагою гомозигот. Гетерозиготи становили 38% від загальної кількості генотипів. Значення очікуваної гетерозиготності по локусу естерази було вищим за наявну на

8,5% (табл.1). За локусом альбуміну в амурського сазана, як і у більшості інших видів риб [1], виявлено два алелі А і В. У даній популяції риб частіше зустрічався алель В (табл.1). Виявлено 3 із трьох можливих генотипів альбуміну, серед яких переважали гетерозиготи (55% від загальної кількості генотипів) та гомозиготи з генотипом ВВ (41%). Очікувана гетерозиготність за даним локусом була меншою від наявної на 22%.

Нами досліджено поліморфізм по локусах CAT та SOD у популяції сазана амурського.

Супероксиддисмутаза – ключовий фермент системи антиоксидантного захисту організму, який здійснює дисмутацію реакційно агресивного супероксиданіонрадикалу до кисню та перекису водню. У ссавців встановлено наявність двох аутомних локусів SOD-S і SOD-M, які кодують відповідно цитозольну і мітохондріальну форми ферменту [4]. Іншими дослідниками у риб виявлено два локуси SOD-1 і SOD-2 [9].

У досліджуваній популяції сазана нами виявлено два електрофоретичні варіанти цього ферменту: F- швидкий і S – повільний. SOD-F зустрічалась найчастіше (табл.2). Статистично достовірної відмінності фактичного розподілу генотипів від очікуваного за законом Харді-Вайнберга нами не встановлено.

Каталаза є одним з найбільш стійких і активних ферментів, що інгібують перекисні процеси, завдяки чому перекис водню не встигає окислити гемоглобін, утворити метгемоглобін і викликати передчасне пошкодження клітини та гемоліз. Нами виявлений поліморфізм по локусу CAT у досліджуваній популяції сазана амурського, який містив дві алельні форми: F- швидку і S – повільну. За розподілом алельних частот переважала швидка форма (табл.2). Очікувана гетерозиготність була нижчою за наявну на 24%. Оскільки розподіл генотипів статистично не відрізнявся від теоретичного, то можна сказати, що досліджувана популяція амурського сазана є врівноваженою по даному локусу.

При оцінці динаміки генетичного стану популяції важливим параметром є гетерозиготність (H). Мутаційний процес, різні типи відбору, дрейф генів та інші фактори популяційної динаміки часто впливають на гетерозиготність популяції [10], особливо при обмеженому потоці генів, тому її оцінка є необхідною умовою в популяційних дослідженнях. По величині зростання гетерозиготності за високополіморфними локусами можна робити оцінку про ефективну величину популяції батьків [11], чи оптимальне кількісне співвідношення самок і самців у популяції та її величину [12]. З поміж шести досліджених локусів найбільша різниця між фактичною гетерозиготністю і очікуваною виявлена у локусах CAT і Alb (рис. 1).

Відмінності між наявною та очікуваною гетерозиготністю у популяції говорить про випадковість у зростанні частот окремих алелей у предків, що пов'язано із недостатнім рівнем обміну генів між субпопуляціями амурського сазана через вплив ізоляції на них. Одночасно вища фактична гетерозиготність досліджуваної популяції по відношенню до очікуваної з співвідношення Харді-Вайнберга вказує на її високий потенціал генетичної мінливості.

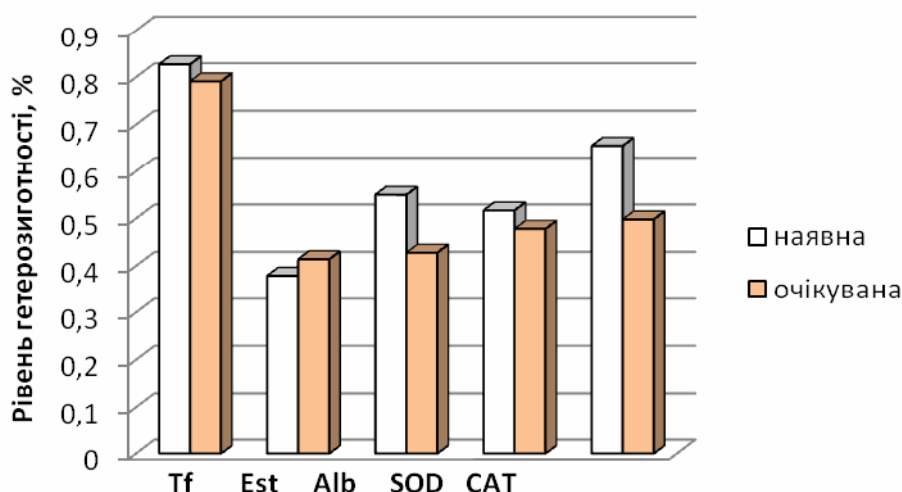


Рис. 1. Рівень наявної і очікуваної гетерозиготності по досліджуваних локусах.

Висновки.

Таким чином, відносно підвищена алейна і генотипова різноманітність генетичної структури дослідженої групи амурського сазана, може бути обумовлена специфікою проведеної з нею селекційної роботи. Виявлений надлишок гетерозигот за окремими локусами свідчить про наявність стабілізаційних процесів генетичної структури.

Обрані генетико-біохімічні системи, в поєднанні з фенотиповими ознаками, можуть слугувати внутрішньовидовими маркерами. Вони можуть бути використані при характеристиці генофонду, для визначенні рівня консолідованості та запасу генетичної мінливості популяції амурського сазана.

Література

1. Кирпичников В. С. Гибридизация европейского карпа с амурским сазаном и селекция гибридов: Автореф. дис., д-ра биол. наук / В.С. Кирпичников. - 1967. - 71 с.
2. Harris H. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics./ H. Harris, D.Hopkinson. -Amsterdam: North-Holland Publ.Comp.,1976. -680p.
3. Gahne B. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. / B.Gahne, RK Juneja, J.Grolmus. - Anim Blood Groups Biochem Genet.,-1977.-V.8,№3.-P.127-37
4. Глазко В.И. Генетика изоферментов сельскохозяйственных животных / В.И. Глазко. – ВИНТИ. Сер. Общая генетика. - Итоги науки и техники, -1988. – Т.10. – 212с.
5. Swofford D. L. BIOSYS-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematic / D.L. Swofford, R.B. Selander // J. Heredity. – 1981. – V. 72. P. 281-283.

6. Маслянюк Р. П. Регуляція гомеостазу заліза у тварин / Р. П. Маслянюк, Л. Я. Пукало // Біологія тварин. – 2006. - Т.8, № 1-2. – С. 80-85.
7. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб / В. С. Кирпичников. - Л.: Наука, 1987.-520 с.
8. Щербенок Ю. И. Связь полиморфных систем эстераз и трансферринов с хозяйственно важными признаками у карпа. /Ю. Щербенок. – Л.: – Биохимическая генетика рыб. Материалы 1-го всесоюзного совещания, 1973. – С.129-137.
8. Паавер Т. Биохимическая генетика карпа (*Cyprinus carpio* L.) / Т. Паавер. – Таллин: «Валгус», 1983. – 122с.
10. Ли Ч. Введение в популяционную генетику / Ч. Ли . - М.: Мир, 1978. – 557 с.
11. Luikart G. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size / G. Luikart, J. M. Cornuet, F. Allendorf // *Conservation Biology*. – 1999. - V. 13, I. 3. - P. 523-530.
12. Ellen G. Using Maximum Likelihood to Estimate Population Size From Temporal Changes in Allele Frequencies / G. Ellen, W. Stalkin, M. Slatkin // *Genetics*. – 1999. V. 152. – P. 755–761.

Summary

S. I. Kras, S.I. Tarasjuk, Mariutsa A.E.

Institute of Fisheries NAAS Ukraine

GENETIC CHARACTERISTICS OF THE FLOCK AMUR CARP (*Cyprinus carpio haematopterus*) ON THE FISH-FARM "LISNEVYCHI"

Analyzed the genetic structure of populations of the Amur carp in five genetic-biochemical systems. Found deviations of the actual distribution of genotype frequencies expected for transferrin locus. Found to increase the actual heterozygosity for all loci studied, except esterase. Concluded that assessment of polymorphism of these genetic-biochemical systems can be a component for objective evaluation of control subjects populations genetic structure in the future.

Key words: *Amur carp, molecular genetic markers, genetic structure, heterozygosity, transferrin, esterase, albumin.*

Рецензент – к.б.н., доц. Божик В.Й.