
СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 597.443:597-115:639.3.032

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ПЛЕМІННИХ ГРУП ВЕСЛОНОСА ЗА ОКРЕМИМИ ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНИМИ СИСТЕМАМИ

О.М. Третьяк, С.І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААН

Проаналізовано генетичну структуру трьох груп веслоноса з різних племінних стад за генетико-біохімічними системами трансферину, альбуміну, естерази, малатдегідрогенази, малік-ензиму та карбоангідрази. З розглянутих генетико-біохімічних систем найбільш інформативними для визначення міжгрупових відмінностей веслоноса за генетичними структурами виявились ферменти MDH, ME, SA. Генетична диференціація між дослідженими групами риб відповідає історії формування досліджених племінних стад веслоноса.

На сучасному етапі розвитку аквакультури в Україні зростає актуальність впровадження маловитратних ресурсоощадних технологій, спрямованих на підвищення ефективності використання біопродукційного потенціалу екосистеми водойм. Особливий інтерес пов'язаний з можливістю введення в іхтіокомплекс внутрішніх водойм планктоноідних риб, що не потребують штучної годівлі, характеризуються прискореним ростом у поєднанні з високою господарською цінністю.

В Україні розв'язання цієї проблеми традиційно здійснюється за рахунок інтродукції далекосхідних рослиноідних риб — білого та строкатого товстолобиків. Проте в умовах ринкової економіки існує необхідність розширення асортименту рибної продукції з впровадженням в аквакультуру найцінніших видів риб. Таким вимогам повною мірою відповідає завезений в нашу країну північноамериканський вид риб, єдиний серед представників ряду осетроподібних планктофаг — веслоніс (*Polyodon spathula* (Walb.)). Високі смакові якості його м'яса, подібно до м'яса білуги, делікатесна чорна ікра, відсутність луски і дрібних кісток, великий відсоток виходу м'яса у поєднанні зі значною потенцією росту дають підставу

вважати веслоноса одним з найцінніших прісноводних видів риб [1–3].

Водночас максимально ефективно використання нових об'єктів риборозведення в умовах інтродукції неможливе без генетичного контролю їх племінних стад, а відсутність генетичного супроводу в процесі формування генетичної структури ремонтно-маточного поголів'я ускладнює одержання груп особин, консолідованих за видоспецифічними господарсько цінними характеристиками. Останніми роками особливої актуальності набувають дослідження генетичних структур культивованих видів риб з використанням методів сучасної молекулярної генетики та різних типів молекулярно-генетичних маркерів [4].

З огляду на обмеженість досліджень з питань вивчення генетичної структури племінних стад веслоноса нами було проведено аналіз поліморфізму й розподілу аельних варіантів окремих генетико-біохімічних систем.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення досліджень за зразками крові риб упродовж 2009 р. використовували три групи ремонтного молодняка веслоноса з племінних стад, яких відтворювали та вирощували у рибниць-

ких господарствах різних еколого-географічних регіонів України.

Відбір зразків крові у груп веслоноса № 1 ($n=15$) та № 2 ($n=14$) здійснювали відповідно восени та навесні з використанням ремонтного стада інтродуцента дослідного господарства “Нивка” ІРГ НААН, розташованого в південній частині Полісся. На зазначене підприємство молодь веслоноса в однорічному віці було завезено з Дніпровського виробничо-експериментального осетрового заводу Херсонської області. До групи ремонтного молодняку веслоноса № 3 ($n=30$) належали риби, відтворювані і вирощувані у рибгоспі “Гірський Тікич” ВАТ “Черкасирибгосп”, розташованому в лісостеповій зоні.

Група риб № 1 складалась з особин масою 1210,6–2479,2 г (у середньому $1748,18 \pm 88,18$ г за $C_v=19,54\%$). Під час весняного відбору проб (група № 2) середня маса риб змінювалась у межах 1401,0–2288,8 г (у середньому $1890,33 \pm 70,67$ г за $C_v=13,99\%$). Маса тіла риб з групи № 3, досліджуваних в осінній період, становила 1024,0–2081,6 г (у середньому $1458,84 \pm 47,77$ г за $C_v=17,93\%$).

Зразки крові від риб відбирали у пластикові пробірки типу “Erpendorf”, дотримуючись правил асептики та антисептики, з наступною консервацією розчином гепарину в розрахунку 25 МО на 1 мл зразка. Центрифугували проби в режимі 3 тис. об./хв упродовж 10 хв і відбирали плазму в окремі пробірки. Транспортування зразків проводили в холодильних камерах за температури 4°C . Зразки плазми та еритроцитів заморозували та зберігали за температури -20°C .

Біохімічними маркерами для багатьох видів риб слугують електрофоретичні спектри білків сироватки крові та різних тканин або спектр ферментів. Електрофоретичний розподіл базується на властивостях самих біологічних молекул. Різні білки відрізняються один від одного молекулярною вагою, структурою, значенням поверхневого електростатичного заряду, тому мають різну рухливість в однорідному електричному полі. У вигляді розподільчого інертного носія часто використовують крохмальний та поліакриламідний гелі, які заливають

у спеціальні камери для проведення горизонтального або вертикального гелелектрофорезів [5].

Молекулярно-генетичними маркерами для опису генетичної структури різних груп веслоноса був розподіл алельних і генотипних частот за локусами, що кодують низку білків і ферментів крові тварин — шість генетико-біохімічних систем: вісім локусів — трансферину (TF), альбуміну (ALB), НАД-залежної малатдегідрогенази (MDH, К.Ф.1.1.1.37), два локуси НАДФ-залежної малатдегідрогенази, або малік-ензиму (ME, К.Ф.1.1.1.40), два локуси естерази плазми крові (EST, К.Ф.3.1.1.1) та карбоангідрази (естераза еритроцитів) (CA, К.Ф. 4.2.1.1.).

Дослідження проводили з використанням методів вертикального поліакриламідного та горизонтального крохмального гелелектрофорезів з подальшим гістохімічним фарбуванням та генотипуванням за алельними варіантами досліджуваних локусів генетико-біохімічних систем крові [5–8]. Для проведення електрофоретичного розділення білків використовували спеціальні камери, виготовлені з органічного скла різних розмірів (залежно від поставлених завдань), зокрема і власних модифікацій. Залежно від білкового маркера, що вивчався, використовували різні буферні системи і підбирали концентрацію гелю (10–16%). При підвищенні іонної сили буферу підвищується сила струму і кількість виділеного тепла, що має вплив на якість отримуваних результатів. Велике значення має рН буфера, оскільки залежно від його показників змінюється величина і напрям руху досліджуваних зразків. Запропонована система є основою багатьох модифікацій при проведенні наших досліджень та досліджень інших авторів [9–11].

Основні популяційно-генетичні параметри (підрхунок частот алельних і генотипних варіантів, характеристика рівня генетичної мінливості, середня гетерозиготність на локус, генетичні дистанції, відхилення генотипних частот від стану рівноваги відповідно до закону Харді-Вайнберга) та достовірність результатів (критерій χ^2 К. Пірсона, критерій Стюдента (t_s)) оцінювали методами математичної статистики та біометрії

відповідно до існуючих методик, а також за допомогою стандартних комп'ютерних програм "BIOSYS-1" [12–14].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою вивчення видоспецифічних особливостей генетичної структури веслоноса виконано порівняльний аналіз за частотою зустрічальності різних алейних варіантів та розподілу генотипів за окремими біохімічними системами крові різних груп риб. Розподіл алейних частот наведено в табл. 1.

Трансферин — маркований білок з двома окремими ділянками, здатний зв'язувати один атом тривалентного заліза. За хімічним складом належить до групи речовин глікопротеїнової природи. Його функція полягає у транспортуванні іонів заліза для побудови гемоглобіну.

Трансферин належить до групи білків з максимально вираженим поліморфізмом. Поліморфізм за цим локусом виявлений більш ніж у 30 видів риб. У всіх досліджених видів, у тому числі і тетраплоїдів, трансферин кодується одним геном [15]. У наших дослідженнях локус трансферину представлений у вигляді трикомпонентного білка, на електрофореграмі розподіляється на три фракції.

Малатдегідрогеназа є ферментом циклу Кребса. За локусом MDH виявлено

два алейні варіанти — Mdh F (швидка зона) і Mdh S (повільна зона). У досліджених груп веслоноса № 1 і № 2 з помітно вищою частотою наявний алейний варіант Mdh F, який становить 0,667 та 0,786 відповідно. У групі риб № 3 обидва алейні варіанти зустрічаються з подібною частотою.

Молекули ферменту малік-ензиму мають тетрамерну будову. У ссавців наявні два аутосомних локуси — ME-s і ME-m, які кодують розчинну і мітохондріальну форми ферменту. Розчинна форма ME рухається до анода швидше, ніж мітохондріальна. У всіх тканинах інтенсивніше проявляється s-ME. Локус ME у нашому дослідженні представлений двома алейними варіантами — Me F і Me S. Між дослідженими групами риб виявлено відмінності за частотою алейнів. Так, у веслоноса з групи № 1 обидва алейні істотно не відрізнялися за частотою. У риб з групи № 2 помітніша перевага алейня з низькою рухливістю (0,607). Швидкий алей у цій групі риб зустрічався з частотою 0,393. Частота швидкого і повільного алейнів у веслоноса з групи № 3 становила 0,600 та 0,400 відповідно.

Одним з важливих білкових компонентів плазми крові є альбумін. В організмі альбуміни беруть участь у неспецифічній адсорбції і перенесенні жирних кислот, аніонів і ліпідів, підтримують

Таблиця 1. Алейні частоти у досліджених груп веслоноса за окремими генетико-біохімічними системами

Група риб	MDH		ME		ALB	
	F	S	F	S	A	B
№ 1 (n=15)	0,667	0,333	0,433	0,567	0,867	0,133
№ 2 (n=14)	0,786	0,214	0,393	0,607	0,929	0,071
№ 3 (n=30)	0,533	0,467	0,600	0,400	0,767	0,233
Загальна (n=59)	0,627	0,373	0,508	0,492	0,831	0,169
	EST		CA			
	F	S	F	S	F	S
№ 1 (n=15)	0,567		0,433		0,500	
№ 2 (n=14)	0,571		0,429		0,536	
№ 3 (n=30)	0,467		0,533		0,717	
Загальна (n=59)	0,517		0,483		0,619	

колоїдно-осмотичний тиск плазми крові і є амінокислотним резервом під час синтезу білків статевих продуктів на початкових етапах дозрівання. У наших дослідженнях локус ALB представлений двома аельними варіантами — А (швидка зона) і В (повільна зона). У всіх груп веслоноса, включених у дослідження, істотна перевага виражена за частотою аельного варіанта з швидкою рухливістю, яка становила 0,867, 0,929 і 0,767 у груп риб № 1, 2 і 3 відповідно. Аельний варіант з повільною рухливістю зустрічався з незначною частотою.

Естерази плазми крові є ферментами, які каталізують у клітинах реакції гідролізу і представляють групу специфічних ферментів, які гідролізують ефірні зв'язки. У нашому дослідженні за системою естерази виявлено два — швидкий (F) і повільний (S) — аельні варіанти. У трьох груп веслоноса істотних відмінностей за частотою розподілу швидкого і повільно аелів не спостерігалось.

За ферментною системою СА виявлено два аельні варіанти — F і S. Істотних відмінностей за частотою обох

алелів у групах веслоноса № 1 і 2 не виявлено. В групі риб № 3 помітно переважав швидкий аель Ca F, який становив 0,717.

Більшість локусів досліджених генетико-біохімічних систем у стаді веслоноса з рибгоспу “Нивка” були генетично врівноваженими, тобто спостерігалась рівновага між фактичними й очікуваними гетерозиготами, що підтверджує нейтральність обраних для аналізу локусів (табл. 2).

Група веслоноса № 1 з господарства “Нивка” за всіма біохімічними системами, включеними в дослідження, характеризувалась найбільш генетично врівноваженим станом, що відрізняє її від інших досліджених груп риб.

Водночас слід відзначити, що група риб № 2 була не врівноваженою за ферментними системами СА ($\chi^2=4,129$, $P=0,042$) та ME ($\chi^2=4,882$, $P=0,027$), тобто у ній наявний статистично достовірний надлишок гетерозигот FS. Генетико-біохімічні системи ALB, MDH, EST у цій групі риб перебували у врівноваженому стані.

Таблиця 2. Наявні та очікувані генотипи за генетико-біохімічними системами у веслоноса, вирощуваного у господарстві “Нивка”

Локус	Генотип	Група риб № 1				Група риб № 2			
		наявні	очікувані	χ^2	P	наявні	очікувані	χ^2	P
CA	FF	3	3,621			2	3,889		
	FS	9	7,759			11	7,222		
	SS	3	3,621	0,411	0,521	1	2,889	4,129	0,042
ALB	AA	11	11,207			12	12,037		
	AB	4	3,586			2	1,926		
	BB	0	0,207	0,258	0,611	0	0,037	0,040	0,841
ME	FF	1	2,690			4	2,037		
	FS	11	7,621			3	6,926		
	SS	3	4,690	3,169	0,075	7	5,037	4,882	0,027
MDH	FF	6	6,552			8	8,556		
	FS	8	6,897			6	4,889		
	SS	1	1,552	0,419	0,517	0	0,556	0,844	0,358
EST	FF	3	4,690			3	4,444		
	FS	11	7,621			10	7,111		
	SS	1	2,690	3,169	0,075	1	2,444	0,497	0,114

У групі веслоноса, відібраного в господарстві “Гірський Тікич” (група № 3), за ферментною системою MDH спостерігався також статистично достовірний надлишок гетерозигот ($\chi^2=6,249$, $P=0,012$). Для всіх інших досліджених генетико-біохімічних систем з цієї групи риб характерний врівноважений стан (табл. 3).

За показниками трьох груп веслоноса (всі групи риб разом) спостерігався статистично достовірний надлишок гетерозигот FS за локусом MDH ($\chi^2=5,186$; $P=0,023$) та EST ($\chi^2=8,650$; $P=0,003$) (табл. 4).

Проведений розрахунок рівня гетерозиготності засвідчив, що у всіх досліджених груп риб рівень середньої гетерозиготності на локус змінюється у близьких межах — 0,457–0,580 (табл. 5). Наявна середня гетерозиготність на локус між групами істотно не відрізнялась і була наближеною до очікуваної середньої гетерозиготності. Можна стверджувати, що за дослідженими генетико-біохімічними системами крові веслоноса виявлена середня гетерозиготність вказує на достатню консолідованість цього виду порівняно з іншими описаними в літературі видами риб [15].

Таблиця 3. Наявні та очікувані генотипи за генетико-біохімічними системами у веслоноса, вирощуваного у господарстві “Гірський Тікич”

Локус	Генотип	Наявні	Очікувані	χ^2	P
CA	FF	14	15,305	1,400	0,237
	FS	15	12,390		
	SS	1	2,305		
ALB	AA	16	17,542	2,550	0,110
	AB	14	10,915		
	BB	0	1,542		
ME	FF	10	10,678	0,267	0,605
	FS	16	14,644		
	SS	4	4,678		
MDH	FF	5	8,407	6,249	0,012
	FS	22	15,186		
	SS	3	6,407		
EST	FF	4	6,407	3,119	0,077
	FS	20	15,186		
	SS	6	8,407		

Таблиця 4. Наявні та очікувані генотипи за генетико-біохімічними системами в усіх досліджених груп веслоноса разом

Локус	Генотип	Наявні	Очікувані	χ^2	P
CA	FF	19	22,462	3,657	0,056
	FS	35	28,077		
	SS	5	8,462		
ALB	AA	39	40,624	2,319	0,128
	AB	20	16,752		
	BB	0	1,624		

Закінчення табл. 4

Локус	Генотип	Наявні	Очікувані	χ^2	P
ME	FF	15	15,128	0,004	0,947
	FS	30	29,744		
	SS	14	14,128		
MDH	FF	19	23,085	5,186	0,023
	FS	36	27,829		
	SS	4	8,085		
EST	FF	10	15,641	8,650	0,003
	FS	41	29,718		
	SS	8	13,641		

Таблиця 5. Середня гетерозиготність за дослідженими локусами у веслоноса

Група риб	Середня гетерозиготність	
	наявна	очікувана
№ 1	0,573±0,086	0,446±0,053
№ 2	0,457±0,129	0,401±0,073
№ 3	0,580±0,051	0,455±0,029
Разом	0,549±0,060	0,448±0,042

Для оцінки відмінностей за генетичною структурою у груп веслоноса проводили аналіз генетичних відстаней між ними. Найменші значення генетичних відстаней виявлені між двома групами веслоноса, які були відібрані в господарстві “Нивка”, і становлять 0,006. Відрізняється від них досліджена третя група веслоноса з господарства “Гірський Тікич”, проте, значення генетичних відстаней невисокі і становлять 0,041 та 0,061 відповідно (табл. 6).

На основі індексу ідентичності (Nei, 1972) побудовано дендрограму, яка дає

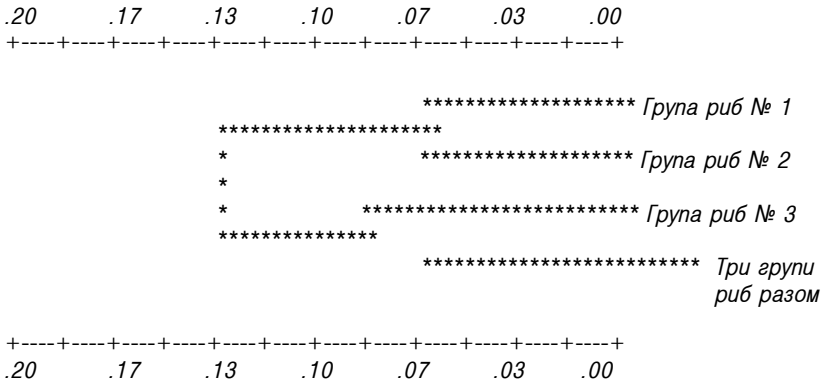
можливість оцінити генетичні взаємовідносини різних груп риб [12]. Дендрограма вказує на генетичну спорідненість досліджених груп веслоноса.

Кластерний аналіз показав, що групи веслоноса, які утримуються в господарстві “Нивка”, є подібними за генетичною структурою і поєднуються в спільний кластер. Інша група веслоноса, вирощена в господарстві “Гірський Тікич”, відрізняється від них і утворює окремих кластер (рисунок).

Таким чином, в оцінених груп веслоноса виявлено поліморфізм локусів за

Таблиця 6. Генетичні відстані (вище діагоналі) та індекс ідентичності (нижче діагоналі), розраховані між групами веслоноса за поліморфними системами [М. Ней, 1972]

Група риб	№ 1	№ 2	№ 3
№ 1	****	0,006	0,041
№ 2	0,994	****	0,061
№ 3	0,960	0,941	****



Дендрограма генетичних взаємовідносин між дослідженими групами веслоноса

окремими дослідженими біохімічними системами. Особливості розподілу аельних частот за виявленими поліморфними локусами засвідчують наявність видоспецифічних характеристик генетичної структури. Кластерний аналіз, виконаний на основі такого розподілу, відповідає відмінностям між групами риб за їх належністю до різних племінних стад, на що вказує дендрограма. Водночас генетична диференціація між групами риб відповідає історії формування окремих племінних стад веслоноса в аквакультурі України.

ВИСНОВКИ

Досліджено генетичну структуру трьох племінних груп веслоноса з різних рибницьких господарств України за генетико-біохімічними системами трансферину, альбуміну, естерази, малатдегідрогенази, малік-ензиму та кар-

боангідази. Виявлено видоспецифічні особливості веслоноса. Із розглянутих генетико-біохімічних систем найбільш інформативними для виявлення міжгрупових відмінностей за генетичними структурами виявились ферменти MDH, ME, CA. Отримані дані дають змогу припустити, що оцінка поліморфізму саме цих систем може сприяти об'єктивному контролю ступеня інбредності племінних стад веслоноса, а також змін їх генетичної структури в поколіннях та різних умовах відтворення і вирощування.

Сумарний розподіл алелів та генотипів за дослідженими локусами відповідає генезису розглянутих груп риб, на що вказує кластерний аналіз, виконаний на основі такого розподілу. Водночас генетична диференціація між групами риб за локусами відповідає історії формування досліджених племінних стад веслоноса.

ЛІТЕРАТУРА

1. Виноградов В.К., Ерохина Л.В., Мельченков Е.А. Биологические основы разведения и выращивания веслоноса (*Polyodon spathula* (Walbaum)). — М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. — 344 с.
2. Онученко О.В., Третяк О.М., Кулешов О.В. Основи рибогосподарського освоєння веслоноса *Polyodon spathula* (Walbaum). — К.: Вища освіта, 2003. — 111 с.
3. Третяк О.М. Система науково обґрунтованого розвитку аквакультури веслоноса в Україні // Рибогосподарська наука України. — 2010. — № 2. — С. 3–25.
4. Грициняк І.І., Тарасюк С.І. Актуальні завдання генетичних досліджень у рибному господарстві // Матеріали семінару «Проблеми розвитку морської та прісноводної аквакультури» / Державний комітет рибного господарства України. — К., 2009. — С. 98–106.
5. Gahne B., Juneja R.K., Grolmus J. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle // Anim. Blood Groups Biochem. Genet. — 1977. — Vol. 8. — № 3. — P. 127–137.
6. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404–408.

7. Harris H., Hopkinson D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics // Amsterdam: North-Holland Publ. Comp., 1976. — 680 p.
8. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. — Л.-М.: Наука, 1977. — 275 с.
9. Richardson M.C., Epstein R., Barnouin O. et al. Multibeam. laser-imploded cylindrical plasmas // 1986, Phys. Rev. A 33. — P. 1246–1253.
10. Глазко В.И. Генетика изоферментов сельскохозяйственных животных. — М.: ВИНТИ. — Сер. Общая генетика. Итоги науки и техники. — 1988. — Т. 10. — 212 с.
11. Грициняк І.І., Нагорнюк Т.А., Тарасюк С.І. Генетична структура порід і породних груп коропів за окремими генетико-біохімічними системами // Рибогосподарська наука України. — 2008. — № 1. — С. 29–33.
12. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. — 1972. — Vol. 106, № 4047. — P. 434–436.
13. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1969. — 368 с.
14. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a Fortrain program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Heredity. — 1981. — Vol. 72. — P. 281–283.
15. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. — Л.: Наука, 1987. — 520 с.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПЛЕМЕННЫХ ГРУПП ВЕСЛОНОСА ПО ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИМ СИСТЕМАМ

А.М. Третьак, С.И. Тарасюк

Проанализировано генетическую структуру трех групп веслоноса из различных племенных стад по генетико-биохимическим системам трансферина, альбумина, эстеразы, малатдегидрогеназы, малик-энзима и карбоангидразы. Из рассмотренных генетико-биохимических систем наиболее информативными для определения межгрупповых отличий веслоноса по генетическим структурам оказались ферменты MDH, ME, CA. Генетическая дифференциация между исследованными группами рыб отвечает истории формирования оцениваемых племенных стад веслоноса.

ANALYSIS OF GENETIC STRUCTURE OF PEDIGREE GROUPS OF PADDLEFISH BY INDIVIDUAL GENETIC-BIOCHEMICAL SYSTEMS

A. Tretyak, S. Tarasyuk

There has been analyzed genetic structure of three groups of paddlefish from different pedigree stocks by genetic-biochemical systems of transferrin, albumin, esterase, malate dehydrogenase, malic-enzyme, and carbonic anhydrase. From the examined genetic-biochemical systems, the most informative for determination of inter-group differences of paddlefish by genetic structures were enzymes MDH, ME, CA. Genetic differentiation between examined groups of fish corresponds to the history of formation of these pedigree stocks of paddlefish.