

В. А. Топтіков,¹ к.б.н., старший науковий співробітник,

В. М. Тоцький,² д.б.н., професор

Т. Г. Алексеєва,² к.б.н., доцент

О. О. Ковтун,³ к.б.н., доцент

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

¹ Біотехнологічний науково-навчальний центр,

² кафедра генетики та молекулярної біології

³ кафедра гідробіології та загальної екології

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: wat.22@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ АСОЦІАТИВНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ НЕГОМОЛОГІЧНИМИ АЛЕЛЯМИ ГЕН-ЕНЗИМНИХ СИСТЕМ В РІЗНИХ УГРУПОВАННЯХ *R. VENOSA* ЧОРНОГО МОРЯ

За допомогою коефіцієнту асоційованості Расела-Рао та коефіцієнту нерівноважності за зчепленням визначали наявність спряженості між алелями різних локусів, що контролюють ензимні системи. Алозиами виявляли шляхом електрофорезу. Досліджували угруповання рапани, які мешкають в різних акваторіях північно-західної частини Чорного моря (Одеська затока, Тарханкут, о. Зміїний). Виявлено, що між окремими алелями локусів ферментів рапани формуються тимчасові асоціації, деякі з яких можуть зберігатися в популяціях тривалий час. Обговорюються умови формування асоціацій алелів та роль цих асоціацій в адаптації тварин і виникненні адаптивних комплексів генів.

Ключові слова: *Rapana venosa*; алозиами; асоціації алелів; адаптивні комплекси генів; Чорне море.

З генетичного погляду морські безхребетні є менш вивченими порівняно з наземними видами. Вивчення генетичних особливостей, популяційної структури видів морських безхребетних є актуальним, оскільки для морських безхребетних властивий цілий спектр особливостей біології, багато з яких відсутні у наземних безхребетних [14]. Значний інтерес викликає рапана жилкувата (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846), бо цей молюск має величезний вплив на функціонування такої ізольованої морської екосистеми, як Чорне море [3, 6, 8, 9, 22, 30].

На підставі багаторічних досліджень на кафедрі генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова професор В. М. Тоцький запропонував гіпотезу адаптивних комплексів генів (АКГ). Відомо, що вагому роль в експресивності тієї чи іншої ознаки грає міжалельна та міжгенна взаємодія. Результатом добору алельних та неалельних генів, який проходить під тиском умов довкілля, є формування у генотипах популяції комплексів генів, які забезпечують оптимальний рівень адаптованості організмів, а в подальшому можуть визначати напрямки мікро- та макроеволюції [16, 17]. Гіпотеза АКГ є логічним

розвитком розуміння геному як цілісної системи, складові елементи якої взаємодіють між собою, і яка реагує як ціле на зовнішні фактори [1].

Рапана демонструє високу здатність пристосування до різних абіотичних та біотичних умов середовища [4, 8, 19, 20, 21, 27, 28, 30]. Цьому моллюску властиві лабільні та гнучкі системи підтримання оптимального рівня життєдіяльності, зокрема антиоксидантна система [7, 18]. Генетико-біохімічні механізми формування високих адаптивних спроможностей *Rapana venosa* практично не з'ясовані. В зв'язку з цим, метою цієї роботи було пошук у генотипах рапани стійких сполучень (спряжень, асоціацій) різних алелей ген-ензимних систем, сукупність яких можна розглядати як АКГ.

Матеріали та методи досліджень

Досліджували поселення статевозрілих рапан віком 3–5 років з північно-західної частини Чорного моря (рис. 1) на протязі 2012 та 2013 років. Моллюсків збирали вручну невивірковим способом влітку (червень–липень) в період їх максимальної активності. У 2012 році аналізували вибірки з Одеської затоки та з акваторії біля мису Тарханкут. У кожній вибірці було представлено по 40 особин обох статей, співвідношення чоловічих та жіночих особин відповідало 1:1. У 2013 році досліджували сукупності з трьох акваторій північно-західної частини Чорного моря: Одеської затоки (40 особин), о. Зміїний (29 особин) і з району біля мису Тарханкут (20 особин). Співвідношення статей у цих вибірках також відповідало 1:1. Таким чином, взагалі проаналізовано 169 представників виду *R. venosa*, з них – 80 з Одеської затоки, 60 – з акваторії біля Тарханкуту, 29 – з району о. Зміїний.

В Одеській затоці рапану збирали на скельній гряді у районі Малого Фонтану в 50 м від берега на глибині 5–7 м. На Тарханкуті, в районі Малого Атлеша, моллюсків збирали на кам'янистій ділянці морського дна з великими скелями на глибині 9–15 м. В акваторії о. Зміїний рапан збирали на західному підводному схилі острова на глибині 7–10 м.

Як тканинне джерело для дослідження ензимів рапани використовували лейблейнівську (стравохідну) залозу. Ця залоза легко гомогенізується, містить значний набір ензимів і має достатню масу навіть у невеликих особин, що дозволяє провести аналіз багатьох ферментних систем в одного індивіда. Крім того, цей орган містить відносно менше жирних сполук, ніж інша велика залоза рапани – гепатопанкреас, що сприяє більш якісному розділу білків за електрофорезу.

Гомогенати отримували як описано в роботі [15]. Здійснювали вертикальний нативний електрофорез за кімнатної температури в пластинах гелю розміром 130×110×1 мм в апараті VE-4М (Хелікон, Росія). Розподіл білків провадили у системі Девіса [23] у 7,5 % ПААГ. Спочатку електрофорез здійснювали при 15 мА і 110 V, поки фронт барвника не досягав біля третини протяжності

гелю, після чого силу та напругу току збільшували до 30 мА і 260 В. Загальна тривалість електрофорезу складала біля 4–5 годин. Ензими в гелях детектували згідно рекомендаціям [25].

Для тестування генотипів всього обрано вісім локусів, з них по два, що контролюють лужну фосфатазу (КФ 3.1.3.1, *Alp*), естеразу (КФ 3.1.1.-, *Est*) і НАДН-оксидазу (КФ 1.6.3.3, *Nox*); по одному локусу представлені алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.1.1, *Adh*) та глутатіонпероксидаза (КФ 1.11.1.9, *Gpx*). Виходячи з відомостей про четвертинну структуру, що частіше зустрічається в досліджуваних ферментів [25], зроблено також припущення про димерну організацію алкогольдегідрогенази та мономерну – для інших обраних ензимів рапани. Аналіз спектрів ізозимів провадили, базуючись на ймовірній генетичній інтерпретації про існування двох алелів у обраному локусі. Зазначена трактовка добре узгоджується з отриманими електрофореграмами. При позначенні алелів додавали у верхньому індексі значення відносної електрофоретичної рухливості алозиму (значення після коми), що контролюється відповідним алелем: *Alp*-1²⁶ і *Alp*-1²³, *Alp*-2¹⁴ і *Alp*-2¹², *Nox*-1¹³ і *Nox*-1¹¹, *Nox*-2⁰⁵ і *Nox*-2⁰⁴, *Est*-1¹⁴ і *Est*-1¹², *Est*-2⁰³ і *Est*-2⁰², *Adh*¹⁰ і *Adh*⁰³, *Gpx*⁴⁶ і *Gpx*³⁶.

Для встановлення спряженостей між різними алелями ген-ензимних систем використовували два підходи.

Розраховували коефіцієнт асоційованості (спраженості) Расела-Рао [5], придатний для бінарних даних:

$$K_a = \frac{a'}{a+b+c+d} = \frac{a}{n},$$

де K_a – коефіцієнт асоційованості, a, b, c, d , – об'єм (кількість, чисельність) конкретної комбінації алелів локусів у досліджуваній сукупності тварин, n – загальна чисельність досліджуваної сукупності.

Спочатку підраховували кількість особин досліджуваного групування, що мали певне сполучення алелів. Отримані величини вносили у чотирьохпольні матриці і на підставі цих даних розраховували коефіцієнт для кожної пари сполучень алелів. Ступінь асоційованості вважали вагомим, якщо значення коефіцієнту перевищувало 0,5.

Для оцінювання статистичного зв'язку між алелями у досліджуваній сукупності рапани обчислювали також коефіцієнт нерівноважності за зчепленням D' [26]. Спочатку визначали різницю між фактичною і очікуваною частотами алелями:

$$D = pApB - qAqB$$

$$D = papb - qaqb$$

$$D = pApb - qAqa$$

$$D = papB - qaqB$$

де p – фактичні, q – очікувані частоти алелів, Aa, Bb – альтернативні алелі локусів.

Нерівноважність виникає як у випадку спряженості між алелями, так і в разі різниці частот алелів у двох локусах. Для нормалізації значення D його поділяють на значення, обране на підставі очікуваних алельних частот:

$$D' = D / D_{\max}$$

Якщо $D > 0$, то D_{\max} обирається як мінімальне значення, отримане в результаті розрахунку наступних виражень:

$$\frac{qA(1-qB)}{qB(1-qA)}$$

У випадку, коли $D < 0$, то в якості D_{\max} виступає максимальне значення з обчислень:

$$\frac{-qAqB}{-(1-qA)(1-qB)}$$

Значення D' знаходиться у діапазоні від 0 до 1. Слід підкреслити, що приведені вище розрахунки коефіцієнту D' правомірні щодо випадків двоалельної структури локусів, що й було прийнято в якості вихідної гіпотези.

Результати досліджень та їх обговорення

Розрахунки асоційованості алелів здійснювали як за даними, отриманими для всіх особин рапани, зібраних у різних акваторіях за обидва роки, так і окремо по роках і різних місць збору тварин.

Найбільша кількість асоціацій між алелями спостерігались для швидкої форми лужної фосфатази *Alp-1*²⁶ і повільної алкогольдегідрогенази *Adh*⁰³ (табл. 1).

Наступним кроком аналізу було зіставити зв'язки між досліджуваними алелями в угрупованнях рапани з різних акваторій та різні роки. Повторюваність асоціацій дозволять вважати їх відображенням адаптивних комплексів генів. Кількість асоційованих алелів та їх комбінації залежали як від року спостережень, так і від акваторії мешкання молюсків (табл. 2, 3). Тобто, виявлені асоціації алелів різних локусів є тимчасовими утвореннями. Сполученням алелів, яке спостерігалось у сукупностей рапани всіх акваторій протягом досліджених років, була асоціація між алелем лужної фосфатази *Alp-1*²⁶ і алелем *Adh*⁰³. Така повторювальна асоціація двох алелів дозволяє оцінити їх як попередника адаптивного комплексу генів, що забезпечує адаптивні властивості *R. venosa* у північно-західній частині Чорного моря.

В інші роки, крім вище зазначених, із загальних асоціацій спостерігались також ще додаткові сполучення алелів різних ген-ензимних систем: у 2012 році – між *Alp-1*²⁶ і *Nox-2*⁰⁴, між *Nox-2*⁰⁴ і *Nox-1*¹¹, у 2013 – між *Est-2*⁰³ і *Adh*⁰³ та інші комбінації.

Таблиця 1

Матриця коефіцієнтів асоційованості алелів для всієї досліджуваної сукупності особин рапани північно-західної частини Чорного моря

Алелі	<i>Alp-1</i>	<i>Alp-2</i>	<i>Nox-1</i>	<i>Nox-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Adh</i>	<i>Gpx</i>
<i>Alp-1</i>	—			<i>Alp-1²⁶/ Nox-2⁰⁴</i>	<i>Alp-1²⁶/ Est-1¹⁴</i>	<i>Alp-1²⁶/ Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1²⁶/ Adh⁰³</i>	
<i>Alp-2</i>	=	—					<i>Alp-2¹²/ Adh⁰³</i>	
<i>Nox-1</i>	=	=	—					
<i>Nox-2</i>	0,53 (0,16)	=	=	—				
<i>Est-1</i>	0,51 (0,11)	=	=	=	—			
<i>Est-2</i>	0,53 (0,18)	=	=	=	=	—	<i>Est-2⁰³/ Adh⁰³</i>	
<i>Adh</i>	0,64 (0,25)	0,58 (0,20)	=	=	=	0,65 (0,27)	—	
<i>Gpx</i>	=	=	=	=	=	=	=	—

Примітка, тут і далі: під діагоналлю вказані значення коефіцієнтів асоційованості та у дужках нерівноважності за зчепленням; = невагомий значення коефіцієнтів; над діагоналлю – асоційовані алелі

Таблиця 2

Матриця коефіцієнтів асоційованості алелів в угрупованнях рапани з різних акваторій північно-західної частини Чорного моря (2012 р.)

Алелі	<i>Alp-1</i>	<i>Alp-2</i>	<i>Nox-1</i>	<i>Nox-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Adh</i>	<i>Gpx</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Акваторія Одеської затоки</i>								
<i>Alp-1</i>	—	<i>Alp-1²³/ Alp-2¹²</i>	<i>Alp-1²³/ Nox-1¹¹</i>	<i>Alp-1²⁶/ Nox-2⁰⁴</i>		<i>Alp-1²⁶/ Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1²⁶/ Adh⁰³</i>	
<i>Alp-2</i>	0,60 (0,53)	—				<i>Alp-2¹⁴/ Est-2⁰²</i>	<i>Alp-2¹²/ Adh⁰³</i>	
<i>Nox-1</i>	0,53 (0,32)	=	—	<i>Nox-2⁰⁴/ Nox-1¹¹</i>	<i>Nox-1¹¹/ Est-1¹²</i>			
<i>Nox-2</i>	0,60 (0,52)	=	0,58 (0,36)	—		<i>Est-2⁰³/ Nox-2⁰⁴</i>		
<i>Est-1</i>	=	=	0,60 (0,47)	=	—			
<i>Est-2</i>	0,63 (0,49)	0,58 (0,47)	=	0,55 (0,38)	=	—		
<i>Adh</i>	0,65 (0,58)	0,60 (0,45)	=	=	=	=	—	
<i>Gpx</i>	=	=	=	=	=	=	=	—

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Акваторія біля мису Тарханкут</i>								
<i>Alp-1</i>	—			<i>Alp-1²⁶/ Nox-2⁰⁴</i>			<i>Alp-1²⁶/ Adh⁰³</i>	
<i>Alp-2</i>	=	—						
<i>Nox-1</i>	=	=	—	<i>Nox-2⁰⁴/ Nox-1¹¹</i>				
<i>Nox-2</i>	0,55 (0,48)	=	0,73 (0,39)	—	<i>Est-1¹⁴/ Nox-2⁰⁴</i>		<i>Adh⁰³/ Nox-2⁰⁴</i>	
<i>Est-1</i>	=	=	=	0,53 (0,31)	—		<i>Est-1¹²/ Adh⁰³</i>	
<i>Est-2</i>	=	=	=	=	=	—		
<i>Adh</i>	0,70 (0,51)	=	=	0,60 (0,35)	0,55 (0,31)	=	—	
<i>Gpx</i>	=	=	=	=	=	=	=	—
<i>Вся вибірка 2012 року</i>								
<i>Alp-1</i>	—	<i>Alp-1²³/ Alp-2¹²</i>	<i>Alp-1²³/ Nox-1¹¹</i>	<i>Alp-1²⁶/ Nox-2⁰⁴</i>		<i>Alp-1²⁶/ Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1²⁶/ Adh⁰³</i>	
<i>Alp-2</i>	0,72 (0,75)	—				<i>Alp-2¹⁴/ Est-2⁰²</i>	<i>Alp-2¹²/ Adh⁰³</i>	
<i>Nox-1</i>	0,53 (0,35)	=	—	<i>Nox-2⁰⁴/ Nox-1¹¹</i>				
<i>Nox-2</i>	0,68 (0,67)	=	0,65 (0,49)	—		<i>Nox-2⁰⁴/ Est-2⁰³</i>	<i>Adh⁰³/ Nox-2⁰⁴</i>	
<i>Est-1</i>	=	=	=	=	—		<i>Est-1¹²/ Adh⁰³</i>	
<i>Est-2</i>	0,58 (0,47)	0,52 (0,31)	=	0,52 (0,30)	=	—		
<i>Adh</i>	0,65 (0,53)	0,65 (0,63)	=	0,59 (0,32)	0,53 (0,38)	=	—	
<i>Gpx</i>	=	=	=	=	=	=	=	—

Зазначена нестабільність формування певних асоціацій генів може бути пов'язана як з природним добром, так і з міграцією інших алелів з других районів проживання рапани. Крім того, створення адаптивних комплексів генів потребує певного часу.

Конкретна фізіологічна роль досліджуваних ензимів і відповідно їх адаптивне значення щодо рапани невідомі. Можна навести лише загальні відомості про функції обраних ензимів у клітині та в цілому організмі.

Значення глутатіонпероксидази в антиоксидантній системі та підтриманні окиснювально-відновного балансу клітини є широко відомим [11, 12]. Алкогольдегідрогеназа, крім розщеплення спиртів та інших токсичних речовин, ви-

Таблиця 3

Матриця коефіцієнтів асоційованості алелів в угрупованнях рапани з різних акваторій північно-західної частини Чорного моря (2013 р.)

Алелі	<i>Alp-1</i>	<i>Alp-2</i>	<i>Nox-1</i>	<i>Nox-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Adh</i>
<i>Акваторія Одеської затоки</i>							
<i>Alp-1</i>	—					<i>Alp-1^{26/}</i> <i>Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1^{26/}</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Alp-2</i>	=	—				<i>Alp-2^{14/}</i> <i>Est-2⁰²</i>	<i>Alp-2^{12/}</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Nox-1</i>	=	=	—				<i>Adh^{03/}</i> <i>Nox-1¹³</i>
<i>Nox-2</i>	=	=	=	—		<i>Nox-2^{04/}</i> <i>Est-2⁰³</i>	<i>Adh^{03/}</i> <i>Nox-2⁰⁴</i>
<i>Est-1</i>	=	=	=	=	—		<i>Est-1^{12/}</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Est-2</i>	0,65 (0,36)	0,53 (0,25)	=	0,58 (0,27)	=	—	<i>Est-2^{03/}</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Adh</i>	0,68 (0,52)	0,58 (0,42)	0,61 (0,47)	0,60 (0,45)	0,58 (0,30)	0,88 (0,60)	—
<i>Акваторія біля мису Тарханкут</i>							
<i>Alp-1</i>	—					<i>Alp-1^{26/}</i> <i>Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1^{26/}</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Alp-2</i>	=	—		<i>Alp-1^{26/}</i> <i>Nox-2⁰⁴</i>			
<i>Nox-1</i>	=	=	—		<i>Nox-1^{11/}</i> <i>Est-1¹²</i>		
<i>Nox-2</i>	=	0,56 (0,35)	=	—			
<i>Est-1</i>	=	=	0,55 (0,33)	=	—		
<i>Est-2</i>	0,55 (0,34)	=	=	=	=	—	

Продовження таблиці 3

Алелі	<i>Alp-1</i>	<i>Alp-2</i>	<i>Nox-1</i>	<i>Nox-2</i>	<i>Est-1</i>	<i>Est-2</i>	<i>Adh</i>
<i>Adh</i>	0,60 (0,42)	=	=	=	=	=	—
<i>Акваторія біля о. Зміїний</i>							
<i>Alp-1</i>	—						<i>Alp-1²⁶/</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Alp-2</i>	=	—		<i>Alp-1²⁶/</i> <i>Nox-2⁰⁴</i>			
<i>Nox-1</i>	=	=	—				<i>Adh⁰³/</i> <i>Nox-1¹¹</i> <i>Adh⁰³/</i> <i>Nox-2⁰⁴</i>
<i>Nox-2</i>	=	0,51 (0,29)	=	—			
<i>Est-1</i>	=	=	=	=	—	<i>Est-2⁰³/</i> <i>Est-1¹²</i>	
<i>Est-2</i>	=	=	=	=	0,53 (0,28)	—	<i>Est-2⁰³/</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Adh</i>	0,66 (0,39)	=	0,59 (0,33)	0,59 (0,31)	=	0,55 (0,29)	—
<i>Вся вибірка 2013 року</i>							
<i>Alp-1</i>	—					<i>Alp-1²⁶/</i> <i>Est-2⁰³</i>	<i>Alp-1²⁶/</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Alp-2</i>	=	—					
<i>Nox-1</i>	=	=	—				
<i>Nox-2</i>	=	=	=	—			
<i>Est-1</i>	=	=	=	=	—		
<i>Est-2</i>	0,56 (0,34)	=	=	=	=	—	<i>Est-2⁰³/</i> <i>Adh⁰³</i>
<i>Adh</i>	0,65 (0,41)	=	=	=	=	0,73 (0,42)	—

конує інтегральні біохімічні та фізіологічні функції [2]. Фосфатази виконують важливі регуляторні [24, 29], енергетичні та транспортні функції [13]. НАДН-оксидаза є важливим компонентом дихального ланцюга у мітохондріях [13]. Крім того, генеруючи супероксидні радикали, вона бере участь у різних регуляторних процесах [12]. Важливість естераз підкреслюється різноманітністю субстратів та реакцій, що ними каталізуються [13].

Привертає до себе увагу той факт, що в різних угрупованнях рапани формується різна кількість асоційованих алелів. Так, найбільша кількість асоційованих алелів ген-ензимних систем спостерігається у сукупностях особин рапани з Одеської затоки, найменша – в Тарханкутській акваторії, проміжне положення займає угруповання рапани, що мешкає біля о. Зміїний. Це добре узгоджується із загальним станом зазначених субпопуляцій рапани [10]. Група особин біля Тарханкуту знаходиться у депресивному стані в зв'язку з поганою трофічною базою, а сукупність рапани в Одеській затоці знаходиться практично у розквіті. Можливо, що в Тарханкутській акваторії відбувається «пошук» найбільш адаптованих для місцевої ситуації генотипів, чим пояснюється незначна кількість асоційованих на даний момент алелів.

На підставі отриманих даних про наявність асоціацій між певними алелями в різних досліджуваних угрупованнях рапани можна припустити такий гіпотетичний механізм формування адаптивних комплексів генів. На першому етапі в популяції (субпопуляції), яка знаходиться у відносно сприятливих умовах існування, виникає значна кількість асоціацій між алелями різних генів. За зміни умов середовища залишаються лише ті асоціації алелів, які забезпечують найбільшу адаптованість особин – їх носіїв. В подальшому за дії природного добору зазначені асоціації алелів закріплюються у популяції – формуються АКГ. Таким чином, тимчасові асоціації алелів можна розглядати як джерело адаптивних комплексів генів.

Висновки

1. Між деякими алелями локусів ферментів рапани формуються тимчасові асоціації.
2. Окремі асоціації алелів можуть зберігатися у популяції протягом декількох років, що може свідчити про їх адаптивне значення. Таким довготривалим сполученням є асоціація між алелями лужної фосфатази *Alp-1*²⁶ і алкогольдегідрогенази *Adh*⁰³.
3. Кількість асоційованих алелів ген-ензимних систем у конкретному угрупованні рапани пов'язана із загальним станом особин у даної акваторії: найбільша кількість комплексів алелів ген-ензимних систем спостерігається у сукупностях особин рапани з Одеської затоки (угруповання у доброму стані), найменша – в Тарханкутській акваторії (угруповання у депресивному стані).

Список використаної літератури

1. Айала Ф. Современная генетика: В 3-х т. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1987. – 295 с., 368 с., 337 с.
2. Ашмарин И. П. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины / И. П. Ашмарин // Усп. биол. химии. – 2003. – Т. 43. – С. 3–18.
3. Бондарев И. П. Динамика руководящих видов современных фаций Черного моря / И. П. Бондарев // Геология и полезные ископаемые Мирового океана. – 2013. – № 3. – С. 78–93.
4. Гаевская А. В. Паразиты, болезни и вредители мидий (*Mytilus*, *Mytilidae*). II. Моллюски (*Mollusca*) / А. В. Гаевская. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – 100 с.
5. Гайдышев И. П. Решения научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++ / И. П. Гайдышев. – СПб: БХВ-Петербург, 2004. – 512 с.
6. Говорин И. А. Оценка влияния хищного брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) на фильтрационный потенциал мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. / И. А. Говорин, А. П. Куракин // Экол. безпека прибереж. та шельф. зон та комплекс. використ. ресурсів шельфу: зб. наук. пр. – 2011. – Т. 25. – С. 435–442.
7. Ершова О. Н. Антиоксидантная активность тканей *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) из акваторий северо-западной части Чёрного моря с различными экологическими условиями / О. Н. Ершова, В. А. Топтиков, Я. А. Терлецкая, Т. И. Лавренюк, С. Г. Каракис, О. А. Ковтун // Вісник ОНУ. – 2014. – Т. 19, № 2(35). – С. 9–20.
8. Заика В. Е. Вселенцы в донной макрофауне Черного моря: Распространение и влияние на сообщества бентали / В. Е. Заика, Н. Г. Сергеева, Е. А. Колесникова // Морський екологічний журн. – 2010. – Т. IX, № 1. – С. 5–7.
9. Иванов Д. А. Влияние вселенца рапаны (*Rapana venosa*) на донные биоценозы в восточной части Черного моря / Д. А. Иванов // Рибе господарство України. – 2012. – № 2. – С. 3–7.
10. Ковтун О. А. Сравнительная морфологическая характеристика *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae, Rapanae) из разных акваторий северной части Черного моря / О. А. Ковтун, В. А. Топтиков, В. Н. Тоцкий // Вісник ОНУ. – 2014. – Т. 19, № 1(34). – С. 68–80.
11. Костюк В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Мн.: БГУ, 2004. – 179 с.
12. Мартинович Г. Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич. – Мн.: БГУ, 2008. – 159 с.
13. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – 1505 с.
14. Пудовкин А. И. Аллозимная популяционная генетика морских беспозвоночных: автореф. ... дис. д.б.н. – 03.0015 – генетика. / А. И. Пудовкин. – СПб, 1998 – 68 с.
15. Топтиков В. А. Особливості протеїназної активності у травному тракті рапани (*Rapana venosa*, Valenciennes) з північно-західної частини Чорного моря / В. А. Топтиков, В. М. Тоцький, Т. Г. Алексеева, О. О. Ковтун // Гідробіол. журнал. – 2014. – Т. 50, № 5 (299). – С. 90–101.
16. Тоцкий В. Н. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы / В. Н. Тоцкий, Н. Д. Хаустова, А. М. Андриевский, Н. Г. Гандирук, Г. И. Белова, Е. В. Есеркепова // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 2. – С. 1791–1799.
17. Тоцкий В. Н. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации / В. Н. Тоцкий, Н. Д. Хаустова, Н. М. Алшибли, А. Л. Сечняк // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 69–75.
18. Тоцкий В. Н. Состояние антиоксидантной системы у представителей *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), обитающих в разных акваториях Одесского залива (Черное море) / В. Н. Тоцкий, О. Н. Ершова, В. А. Топтиков, О. А. Ковтун, А. Г. Драгоева, Т. И. Лавренюк // Вісник ОНУ. – 2013. – Т. 18, № 1(30). – С. 7–15.
19. Чухчин В. Д. Функциональная морфология рапаны / В. Д. Чухчин. – К.: Наукова думка, 1970. – 138 с.
20. Чухчин В. Д. Экология брюхоногих моллюсков Черного моря / В. Д. Чухчин. – К.: Наук. думка, 1984. – 176 с.
21. Шадрин Н. В. Питание и распределение *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) в акватории Опуцкого заповедника (Восточный Крым, Черное море) / Н. В. Шадрин, Т. А. Афанасова // Морський екологічний журн. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 24.
22. Bondarev I. P. Dynamics of *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Muricidae) population in the Black Sea / I. P. Bondarev // Intern. J. Marine Sci. – 2014. – V. 4, № 03. – P. 42–56.
23. Davis B. I. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins / B. I. Davis // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – Vol. 121, No 2. – P. 404–427

24. Janssens V. Protein phosphatase 2a: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling / V. Janssens, J. Goris // *Biochem. J.* – 2001. – V. 353. – P. 417–439.
25. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels / G. P. Manchenko. – CRC Press LLC, 2003. – 592 p.
26. Mueller J. C. Linkage disequilibrium for different scales and applications / J. C. Mueller // *Briefings in bioinformatics.* – 2004. – Vol. 5, No 4. – P. 355–364.
27. Mann R. Salinity tolerance of larval *Rapana venosa*: implications for dispersal and establishment of an invading predatory gastropod on the North American Atlantic coast / R. Mann, J. M. Harding // *Biol. Bull.* – 2003. – No. 204, February. – P. 96–103.
28. Savini D. Consumption rates and prey preference of the invasive gastropod *Rapana venosa* in the Northern Adriatic Sea / D. Savini, A. Occhipinti-Ambrogi // *Helgol. Mar. Res.* – 2006. – V. 60. – P. 153–159.
29. Seger R. The MAPK signaling cascade / R. Seger, E. G. Krebs // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9, № 9. – P. 726–735.
30. Zolotarev V. The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusk species / V. Zolotarev // *PSZNJ: Mar. Ecology.* – 1996. – Vol. 17 (1–3). – P. 227–236.

В. А. Топтиков, В. Н. Тоцкий, Т. Г. Алексеева, О. А. Ковтун
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: wat.22@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ АССОЦИАТИВНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ НЕГОМОЛОГИЧНЫМИ АЛЛЕЛЯМИ ГЕН-ЭНЗИМНЫХ СИСТЕМ В РАЗНЫХ ГРУППИРОВКАХ РАПАНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ

Резюме

С помощью коэффициента ассоциированности Рассела-Рао и коэффициента неравновесности по сцеплению определяли наличие сопряженности между аллелями разных локусов, контролирующих энзимные системы. Алозимы выявляли путем электрофореза. Исследовали группировки рапаны, обитающие в различных акваториях северо-западной части Черного моря (Одесский залив, Тарханкут, о. Змеиный). Выявлено, что между отдельными аллелями локусов ферментов рапаны формируются временные ассоциации, некоторые из которых могут сохраняться в популяциях длительное время. Обсуждаются условия формирования ассоциаций аллелей и роль этих ассоциаций в адаптации животных и возникновении адаптивных комплексов генов.

Рапана жилковатая (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846) оказывает существенное влияние на функционирование такой изолированной морской экосистемы, как Черное море. Однако многие аспекты ее жизнедеятельности, в том числе генетико-биохимические механизмы формирования высоких адаптивных возможностей, практически не известны. В связи с этим, целью работы было поиск в генотипах рапаны устойчивых сочетаний (сопряжений, ассоциаций) различных аллелей ген-энзимных систем, совокупность которых можно рассматривать как адаптивные комплексы генов.

Исследовали моллюсков из трех акваторий северо-западной части Черного моря (Одесский залив, мыс Тарханкут, о. Змеиный). Всего было проанализировано 169 представителей вида *R. venosa*. Электрофоретическое разделение гомогенатов, полученных из лейбленовской железы моллюсков с целью выявления аллозимов проводили в ПАА-гелях. Изучали следующие ферменты: ЩФ,

НАДН-оксидазу, естеразу, алкогольдегідрогеназу и глутатионпероксидазу. Для тестирования генотипов было выбрано восемь локусов, из них по два, контролирующие ЩФ, эстеразу и НАДН-оксидазу; по одному локусу были представлены алкогольдегідрогеназа и глутатионпероксидаза. При проведении генетического анализа исходили из гипотезы о двуаллельном строении исследуемых локусов. Наличие сопряженности между аллелями разных локусов, контролирующих энзимные системы, определяли с помощью коэффициента ассоциированности Рассела-Рао и коэффициента неравновесности по сцеплению.

Выявлено, что между некоторыми аллелями локусов ферментов рапаны формируются временные ассоциации. Отдельные ассоциации аллелей могут храниться в популяции в течение нескольких лет, что может свидетельствовать об их адаптивном значении. Таким длительным сочетанием является ассоциация между аллелями щелочной фосфатазы *Alp-1*²⁶ и алкогольдегідрогеназы *Adh*⁰³. Количество ассоциированных аллелей ген-энзимных систем в определенной группировке рапаны связано с общим состоянием особей в данной акватории: наибольшее количество комплексов аллелей ген-энзимных систем наблюдается в совокупностях особей рапаны Одесского залива (группировка в хорошем состоянии), наименьшая – в акватории мыса Тарханкут (группировка в депрессивном состоянии). Сделано предположение о роли ассоциаций аллелей в адаптации: обнаружены временные сочетания негомологичных аллелей могут выступать в качестве источника адаптивных комплексов генов.

Ключевые слова: *Rapana venosa*; аллозимы; ассоциации аллелей; адаптивные комплексы генов; Черное море.

V. A. Toptikov, V. M. Tots'kiy, T. G. Aliksieieva, O. O. Kovtun

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, wat.22@mail.ru

FEATURES OF ASSOCIATIVE LINKS BETWEEN NONHOMOLOGOUS ALLELES OF THE GENE-ENZYME SYSTEMS IN DIFFERENT *RAPANA* GROUPS OF THE BLACK SEA

Abstract

Rapa whelk (*Rapana venosa*, Valenciennes, 1846) has a great influence on the operation of such an isolated marine ecosystem, as the Black Sea. However, many aspects of its vital functioning, including the genetic and biochemical mechanisms of *Rapana* high adaptive capacity, are practically unknown. Therefore, the aim of this work was to find among *Rapana* genotypes stable combinations (pairings, association) of different alleles of gene-enzyme systems, the totality of which can be regarded as adaptive gene complexes.

The shellfish from waters of the three north-western parts of the Black Sea (Odesa Bay, cape Tarhankut and island Zmiinyi) were investigated. 169 individuals of species *R. venosa* were analyzed. The homogenates for electrophoretic separation were prepared from gland of Leiblein of molluscs; the identification of allozymes was performed in PAA-gels. The eight loci, including two for the following enzymes – alkaline phosphatase, *esterase* and *NADH* oxidase were chosen to test genotypes; the alcohol dehydrogenase and glutathione peroxidase were represented by one locus for each enzyme. In conducting the genetic analysis we based on the hypothesis

about the two-allele structure of the investigated loci. The presence of conjugation between alleles of different loci, controlling different enzyme systems, was determined by the coefficient of association and Russell-Rao coefficient of linkage disequilibrium.

It was found that temporary associations were formed between certain alleles of enzyme loci. Specific association of alleles in a population can be kept for several years; this fact may indicate their adaptive value. The example of such combination is a long association between alleles of alkaline phosphatase *Alp-1*²⁶ and the alcohol dehydrogenase *Adh*⁰³. The number of associated alleles of the gene-enzyme systems to a certain *Rapana* group is connected with the general state of the animals in the waters: the largest number of complexes between alleles of gene-enzymes systems was observed in a set of Odesa Bay *Rapana* individuals (grouping in a good condition), the lowest – in Tarkhankut waters (grouping in the depressed condition). It is suggested that the role of the alleles in the adaptation of associations: temporary non-homologous combinations of alleles that were found can act as a source of adaptive gene complexes. It is suggested that the role of the alleles associations is important for the adaptation: detected temporary combination of non-homologous alleles can act as a source of adaptive complexes

Key words: *Rapana venosa*; allozymes; allelic association; adaptive gene complexes; Black Sea

REFERENCES

1. Ayala FJ, Kiger Jr (1987) "Modern genetics"[Sovremenniaia genetyka], В 3-х т. М.: Mir, p 295, p 368, p 337.
2. Ashmarin IP (2003) "Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины" [Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины], The successes of Biological Chemistry, No 43, pp 3–18.
3. Bondarev IP (2013) "The dynamics of leading species of modern facies in the Black Sea" [Dynamika rukovodshchikh vydov sovremennykh fatsyi Chernoho moria], Geology and Mineral Resources of the World Ocean, No 3, pp 78-93.
4. Gaevskaia AV (2006) Parasites, diseases and pests of mussels (*Mytilus*, Mytilidae). II. Mollusca [Parazyty, bolezny i vreditely mydyi (*Mytilus*, Mytilidae). II. Molliusky (Mollusca)], Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 100 p.
5. Gaidyshev YP (2004) Decisions of scientific and engineering problems by means of Excel VBA and C/C++ [Resheniya nauchnykh i ynzhenerykh zadach sredstvamy Excel, VBA i C/C++], SPb: BKhV-Peterburh, 512 p.
6. Govorin YA, Kurakyn AP (2011) Assessing the impact of predatory gastropod *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) to the filtration capacity of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam., Ecological safety of coastal and shelf zones and complex use of shelf resources [Otsenka vliyaniya khyshchnoho briukhonohoho molliuska *Rapana venosa* (Valenciennes, 1864) na fyltratsyonnyi potentsyal mydyi *Mytilus galloprovincialis* Lam., Ekolohichna bezpeka pryberezhnoi ta shelfovoi zon ta kompleksne vykorystannia resursiv shelfu], Vol 25, pp 435–442.
7. Yershova OM, Toptikov VA, Terletska YaO, Lavrenyuk TI, Karakis SG, Kovtun OO (2014) Antioxidant activity of tissue *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) from the regions of the northwestern Black Sea different environmental conditions [Antyoksydantnaia aktyvnost tkanei *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) yz akvatoryi severo-zapadnoi chasty Chernogo moria s razlichnymy ekolohycheskymy uslovyamy], Odesa National University Herald. Biology, Vol 19, No 2(35), pp 9-20.
8. Zaika VE, Sergeeva NG, Kolesnikova EA (2010) Alien species in bottom macrofauna of the Black Sea: their distribution and influence on benthic communities [Vselentsy v donnoi makrofaune Chernogo moria: Rasprostraneniye y vliyaniye na soobshchestva bentaly], Marine Ecological Journal, Vol 9, No 1, pp 5–7.
9. Ivanov DA (2012) The influence of the acclimatized *Rapana* (*Rapana venosa*) on benthic biocoenoses in the eastern Black Sea [Vliyaniye vselentsa rapany (*Rapana venosa*) na donnye byotsenozy v vostochnoi chasty Chernogo moria], Fishing industry of Ukraine, No 2, pp 3-7.
10. Kovtun OO, Toptikov VA, Totsky VM (2014) Comparative morphological characteristic of *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae, Rapaninae) from different water areas of the northern part of the Black sea [Srav-

- nytelnaia morfolohyheskaia kharakterystyka *Rapana venosa* (Gastropoda: Muricidae, Rapaninae) iz raznykh akvatoryi severnoi chasty Chernogo moria], Odesa National University Herald, Vol 19, No 1(34), pp 68-80.
11. Kostyuk VA, Potapovich AI (2004) Bioradicals and bioantioxidants [Bioradykaly i bioantyoksidanty], Minsk : BSU, 179 p.
 12. Martinovic GG, Cherenkevich SN (2008) The redox processes in cells [Okislitelno-vosstanovitelnye protsessy v kletkakh], Minsk: BSU, 159 p
 13. Metzler DE (1980) The chemical reactions of living cells [Okislitelno-vosstanovitelnye protsessy v kletkakh], Mosow : Mir, 1505 p.
 14. Pudovkyn AI (1998) Allozyme population genetics of marine invertebrates [Allozymnaia populiatsyonnaia henytyka morskikh bespozvonochnykh. Avtoref. ...dys. d.b.n], SPb, 68 p.
 15. Toptikov VA, Tots'kiy VM, Aliksieieva TG, Kovtun OO (2014) Peculiarities of proteinase activity in digestive tract of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) from the north-western section of the Black Sea [Osoblyvosti proteinaznoi aktyvnosti u travnomu trakti rapany (*Rapana venosa*, Valenciennes) z pivnichno-zakhidnoi chastyny Chornoho moria], Hydrobiological Journal, Vol. 50, No. 5(299), pp. 90-101.
 16. Totskiy VN, Khaustova ND, Andryevskiy AM, Handyruk NH, Belova HY, Eserkepova EV (1990) The expressiveness of the gene-enzyme systems and indicators of viability in the ontogeny of inbred lines and hybrids of *Drosophila* [Ekspressivnost hen-enzimnykh sistem i pokazateli zhiznesposobnosti v ontogeneze inbrednykh liniy y gibrydov drozofily], Russian Journal of Genetics, Vol 35, No 3, pp 69-75.
 17. Totskiy VN, Khaustova ND, Alshibli NM, Sechnyak AL (2002) Biochemical mechanisms of ontogenetic and phylogenetic adaptation [Genetyko-biokhimycheskie mekhanizmy ontogeneticheskoi i filogeneticheskoi adaptatsii], Cytology and Genetics, Vol 36, No 3, pp 69-75.
 18. Totskiy VN, Ershova ON, Topikov VA, Kovtun OA, Drahoeva AG, Lavreniuk TI (2013) Antioxidant system of *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) representatives, the inhabitants of different water areas of the Odessa Bay (the Black sea) [Sostoianye antyoksydantnoi sistemy u predstavitelei *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), obytauishchykh v raznykh akvatoryakh Odesskogo zalывa (Chernoe more), Odesa National University Herald, Vol 18, No 1(30), pp 7-15.
 19. Chukhchin VD (1970) Functional morphology of *Rapana* [Funktionalnaia morfologiya rapany], Kiev : Naukova Dumka, 138 p.
 20. Chukhchin VD (1984) The ecology of gastropods of the Black Sea [Ekologiya briukhonohikh molliuskov Chernogo moria], Kiev : Naukova Dumka, 176 p.
 21. Shadrin NV, Afanasyev TA (2009) Nutrition and the distribution of *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in the waters of Opuksky Reserve (Eastern Crimea, the Black Sea) [Pytanie i raspredelenye *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) v akvatorii Opukskoho zapovednyka (Vostochnii Krym, Chernoe more)], Marine Ecological Journal, Vol. 8, No 2, p. 24
 22. Bondarev IP (2014) Dynamics of *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Muricidae) population in the Black Sea, Intern. J. Marine Sci, Vol 4, No 03, pp 42-56.
 23. Davis BI (1964) Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci, Vol. 121, No 2, pp. 404-427.
 24. Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2a: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling, Biochem. J., Vol 353, pp 417-439.
 25. Manchenko GP (2003) Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels, CRC Press LLC, 592 p.
 26. Mueller JC (2004) Linkage disequilibrium for different scales and applications, Briefings in bioinformatics, Vol 5, No 4, pp 355-364.
 27. Mann R, Harding JM (2003) Salinity tolerance of larval *Rapana venosa*: implications for dispersal and establishment of an invading predatory gastropod on the North American Atlantic coast, Biol. Bull, No 204, pp 96-103.
 28. Savini D, Occhipinti-Ambrogi A (2006) Consumption rates and prey preference of the invasive gastropod *Rapana venosa* in the Northern Adriatic Sea, Helgol. Mar. Res, Vol 60, pp 153-159.
 29. Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade, FASEB J., Vol 9, No 9, pp 726-735.
 30. Zolotarev V (1996) The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusk species, PSZNJ: Mar. Ecology, Vol. 17, No 1-3, pp 227-236.