

УДК 575.174.015.3

В. В. ЗАМОРОВ, Д. Б. РАДІОНОВ, І. О. ХРИСТОФОРОВА, В. О. КУЧЕРОВ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026

ПОЛІМОРФІЗМ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ БИЧКА-ПІСОЧНИКА *NEOGOBIOUS FLUVIATILIS* (PALLAS) В ПРИДУНАЙСЬКОМУ ОЗЕРІ КОТЛАБУХ

Використовуючи метод лужного електрофорезу в поліакриламідному гелі, здійснили аналіз генетичної структури угруповання бичка-пісочника в озері Котлабух. Вивчено частоти генотипів та алелів за локусами тканинних естераз та міогенів. Показано достовірну різницю між виявленими та очікуваними частотами генотипів по поліморфним локусам. Проведено аналіз біохімічних маркерів та виявлено поліморфізм для чотирьох генів.

Ключові слова: *N. fluviatilis*, бичок-пісочник, популяція, генетична структура, алелі, естерази, міогени

В континентальних водоймах України, в тому числі придунайських озерах, найбільш чисельним видом серед бичкових риб є бичок-пісочник *Neogobius fluviatilis* (Pallas). Цей вид відіграє важливу роль в екосистемах озер і може бути потенційно промисловим. Проте його внутрішньовидова структура у водоймах Північно-Західного Причорномор'я, зокрема, в придунайських озерах, нині практично не вивчена.

Різні ензимні системи широко використовуються як маркери мінливості, за якими можна досліджувати генетичну структуру популяцій різних видів. Вивчення ензимів дозволяє виявити ступінь спорідненості між різними угрупованнями, а також їх пристосованість і чутливість до різних зовнішніх чинників. Відомо, що існує широкий діапазон біохімічної мінливості в популяціях різних видів риб, у тому числі і родини бичкових (Gobiidae) [Доброволов, Пинчук, 1993; Kotze, van der Bank, 1998; Charles, 1999; Li Si-Fa, Zhao Yan, 2011]. Дослідження у цій царині є достатньо актуальними [Ivanova, Dobrovolog, 2013; Заморов, Радионов, 2014; Кулікова, Заморов та ін., 2015], їх результати мають значення не тільки для еволюціоністів, а також для господарської діяльності і екологічного моніторингу.

Виходячи з цього, метою дослідження було проведення аналізу генетичної структури бичка-пісочника придунайського озера о Котлабух за локусами, які кодують множинні молекулярні форми біохімічних маркерів.

Матеріал і методи досліджень

Іхтіологічний матеріал зібрано співробітниками кафедри гідробіології та загальної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Для досліджень використовували особин бичка-пісочника, які були виловлені в озері Котлабух восени 2012 р.

Для виявлення спектра молекулярних форм біохімічних маркерів використовували індивідуальні гомогенати м'язової тканини бичків (20 самців і 20 самок). Для електрофоретичного фракціонування водорозчинних естераз використовували 6% поліакриламідний гель (ПААГ) і буферну систему – трис-борат-ЕДТА [Принципы..., 2015]. Електрофорез проводили в системі вертикального пластинчатого гелю (розміри 140×120×1 мм) за допомогою апарату VE4 (Росія). Гель для розділення в електрофоретичній камері витримували 12 годин. Після введення проб в камеру, преелектрофорез проводили впродовж 20–30 хв. до входження БФС в основний гель при 80 мА. Після цього силу струму збільшували до 200 мА. Пре- та основний електрофорез проводили в охолодженому буфері при температурі 4 °С.

Методи гістохімічного виявлення молекулярних форм ензимів в гелі – естераз, лактатдегідрогенази (ЛДГ), малатдегідрогенази (МДГ) і міогенів, після припинення електрофоретичного розділення, описано в роботі Л. І. Корочкина [Корочкин и др., 1977]. Алозими та варіанти генів, які їх кодували, визначали за електрофоретичною рухливістю: менш рухливий алозим позначали як *S* (Slow), а більш рухливий – як *F* (Fast). Для розрахунку частот генотипів за локусами біохімічних поліморфних маркерів у вибірках риб використовували формулу Харді-Вайнберга [Тоцький, 2008]. Ступінь відповідності спостережуваних частот генотипів до теоретично очікуваних проводили з використанням методу χ^2 [Атраментова, Утєвська, 2007].

Результати досліджень та їх обговорення

Проведення якісного аналізу експресії ферментів естеролітичної системи бичка-пісочника показало, що незалежно від статі риб, їх спектр характеризувався наявністю п'яти основних молекулярних форм естераз, кожна з яких, найбільш ймовірно, кодується різними аутосомними локусами, що позначені нами, згідно з анодною рухливістю, як *Es1* – *Es5* [Shaklee, 1990]. Дослідження електрофореграм спектру форм естераз бичків дозволив знайти наявність спадкового поліморфізму тільки для локусу 2. Для цієї ген-ензимної системи виявлено два алозими, рухливість яких чітко розрізнялася в поліакриламідному гелі в умовах лужного електрофорезу.

Вивчення електрофоретичного спектра міогенів бичка-пісочника дозволило виявити велику кількість електроморф цієї форми білків. Використовуючи загальноприйнятий в біохімічній генетиці підхід «один ген – одна пофарбована зона гелю» [Алтухов, Салменкова, 1972] можна отримати максимальну оцінку локусів, які кодують міогени у риб. Максимально можлива кількість таких генів згідно з нашими даними у бичка-пісочника складала 12, при цьому нумерацію проводили за спаданням анодної рухливості поділюваних при електрофорезі білків. Такий принцип нумерації локусів біохімічних маркерів є загальноприйнятим у популяційно-генетичних дослідженнях риб [Shaklee, 1990; Avise, 2004]. Поліморфізм виявлено для локусів міогенів 1, 3 і 7.

Отже, можна зробити висновок, що наявністю поліморфізму в угрупованні бичка-пісочника озера Котлабух характеризуються гени естераз і міогенів, тому саме ці маркери доцільно використовувати в подальшому, при аналізі генетичної внутрішньовидової структури цього виду риб.

Аналіз спектру тканинних ЛДГ бичка-пісочника виявив наявність декілька фенотипових класів, представлених трьома множинними молекулярними формами. Виявлений характер розподілення ізозимів лактатдегідрогенази, згідно анодної рухливості в поліакриламідному гелі, вказує на те, що даний фермент є димером, субодиниці якого кодовані двома генами.

Дослідження електрофореграм екстрактів м'язових тканин бичка-пісочника озера Котлабух виявив наявність п'яти ізоформ МДГ. Це свідчить про те, що даний фермент складається з чотирьох субодиниць, які кодуються двома генами. В досліджуваному локалітеті бичків поліморфізму за генами, які кодують вказані множинні молекулярні форми ферментів ЛДГ і МДГ виявлено не було. Саме тому, для аналізу генетичної структури угруповання бичків з озера Котлабух використовували локуси естераз і міогенів.

Вивчення частот алелів за локусом естерази 2 в локалітеті бичка-пісочника озера Котлабух у 2012 році виявив, що *F*-варіант гену зустрічався значно частіше, за другим алель, який кодує менш рухому форму м'язового естеролітичного ферменту риб. Частота *F*-алелю гену естерази 2 в даному локалітеті складала 0,89, а частота другого гену була всього 0,11 (рис. 1).

Аналіз спектру частот алелей за поліморфними локусами розчинних м'язових протеїнів в угрупованні бичка-пісочника озера Котлабух показав, що за локусом міогену 1 частота *S*-алелю була значно вищою (0,87) за аналогічний показник другого алелю (рис. 1). Частоти алелей за локусами міогенів 3 і 7 достовірно не відрізнялись одні від інших.

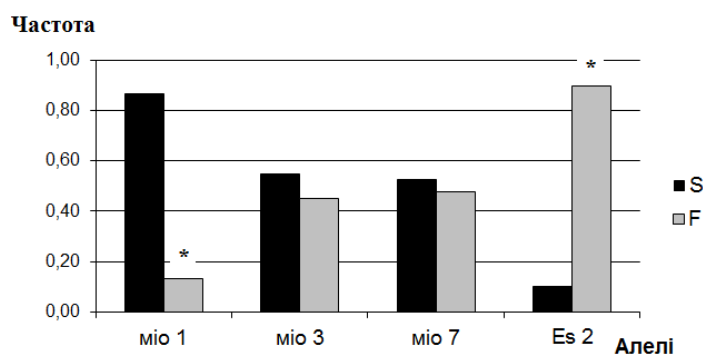


Рис. 1. Частоти алелей за поліморфними локусами біохімічних маркерів в угрупованні бичка-пісочника озера Катлабух в 2012 р.

Примітка: * – нульова гіпотеза о рівності частот алелей відхилялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P = 0,05$). $n=40$

Порівняльний аналіз частот виявлених і теоретично очікуваних генотипів за поліморфними локусами естераз і міогенів показав, що ці показники в угрупованні риб в озері Котлабух достовірно відрізнялись за двома локусом, які кодували міоген 7 і естеразу 2 (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл генотипів за поліморфними локусами що кодують розчинні м'язові білки (міогени) в угрупованнях бичка-пісочника

Генотип	Локус	Частота (спостережувана)	Частота (очікувана)	χ^2
<i>S/S</i>	Es 2	0,05	0,01	3,95
<i>S/F</i>		0,10	0,18	
<i>F/F</i>		0,85	0,81	
<i>S/S</i>	Mio 1	0,79	0,75	1,82
<i>S/F</i>		0,16	0,23	
<i>F/F</i>		0,05	0,02	
<i>S/S</i>	Mio 3	0,30	0,32	0,02
<i>S/F</i>		0,50	0,50	
<i>F/F</i>		0,20	0,18	
<i>S/S</i>	Mio 7	0,19	0,27	4,44
<i>S/F</i>		0,67	0,50	
<i>F/F</i>		0,14	0,23	

Примітка: * – нульова гіпотеза о рівності частот в генеральних сукупностях відхилялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P = 0,05$). $n=40$.

За іншими генами зустрічальність достовірних відмінностей між спостережуваними та очікуваними частотами генотипів не спостерігали. Це свідчить про те, що дана група риб, за одним з 21 досліджуваного гену, була невірноваженою і на неї могли впливати фактори динаміки генетичної структури популяцій (природний добір, дрейф генів, міграції тощо), але їх дію на риб можна вважати не суттєвою.

Висновки

1. Аналіз генетичної структури угруповання бичка-пісочника в озері Котлабух у 2012 році за локусами біохімічних маркерів виявив наявність поліморфізму для 4 з 21 досліджуваного гену.
2. В досліджуваному угрупованні риб для локусів МДГ і ЛДГ не відзначено поліморфізму.
3. Порівняння виявлених і очікуваних, розрахованих згідно формули Харді-Вайнберга, частот генотипів по поліморфним локусам показало наявність достовірної різниці між цими показниками в угрупованні бичка-пісочника за локусами міогену 7 і естерази 2. За іншими локусами ці показники достовірно не відрізнялися.

1. Алтухов Ю. П. О числе мономорфных и полиморфных локусов в популяции кеты *Oncorhynchus keta* Walb. – одного из тетраплоидных видов лососевых / [Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А., Омельченко В. Т. и др.] // Генетика. — 1972. — 8, № 2. — С. 67—75.
2. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології: Підручник / Атраментова Л. О., Утєвська О. М. — Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
3. Доброволов И. С. Генетическая дивергенция черноморских видов бычков группы Ponticola, оцененная по биохимическим генным маркерам / Доброволов И. С., Пинчук В. И. // Вестник зоологии — 1993. — № 2. — С. 58—63.
4. Заморов В. В. Полиморфизм по локусу β-эстераз бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* Одесского залива и акватории острова Змеиный / Заморов В. В., Радионов Д. Б. // Гидробиологический журнал. — 2014. — Т. 50, № 3. — С. 67—77.
5. Корочкин Л. И. Генетика изоферментов / [Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др.]. — Москва: Наука, 1977. — 275 с.
6. Кулікова О. В. Динаміка генетичної структури угруповання бичка-кругляка *Neogobius melanostomus* в Тилігульському лимані за локусами естераз / Кулікова О. В., Заморов В. В., Кучеров В. О., Радіонов Д. Б. // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Серія біологія — 2015. — № 3 — 4, Т. 64. — С. 376—380.
7. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / ред. К. Уилсона и Дж. Уолкера. — М.: БИНОМ Лаборатория знаний. — 2015. — 848 с.
8. Тоцький В. М. Генетика // Одеса: «Астропринт», 2008. — 712 с.
9. *Aise C. J. Molecular markers, natural history and evolution* – Sanderland. Massachusetts. Sinauer Ass. Inc., 2004. — 640 p.
10. *Charles F. B. Among-locus variation in Fst: fish, allozymes and the Lewontin-Krakauer test revisited* / Charles F. B. // Genetics — 1999. — Vol. 152 — P. 653—659.
11. *Ivanova P. Protein Biomarkers for Identification of Some Gobiid Species (Actinopterygii: Gobiidae) along the Bulgarian Black Sea Coast* / [Ivanova P., Dobrovolo I., Apostolou A. et al.] // Acta zool. bulg. — 2013. — Vol. 65, N 4. — P. 429—438.
12. *Kotze A. Allozyme variation in two populations of Hydrocynus vittatus* / Kotze A. Van der Bank F. H., Steyn G. J. // Afr. J. Anim. Sci. — 1998. — Vol. 28, N 3/4. — P. 153—160.
13. *Li Si-Fa. Possible genetic reproductive isolation between two tilapiine genera and species: Oreochromis niloticus and Sarotherodon melanotheron* / Li Si-Fa, Zhao Yan, Fan Wu-Jiang, Cai Wan-Qi, Xu Ying-Fang // Zoological Research — 2011. — Vol. 32, N 5. — P. 521—527.
14. *Shaklee J. B. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish* / Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C. Whitt G. S. // Transaction Amer. Fish. Soc. — 1990. — Vol. 119. — P. 2—15.

В. В. Заморов, Д. Б. Радионов, И. А. Христофорова, В. А. Кучеров
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова

ПОЛИМОРФИЗМ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БЫЧКА-ПЕСОЧНИКА В ПРИДУНАЙСКОМ ОЗЕРЕ КОТЛАБУХ

Используя метод щелочного электрофореза в полиакриламидном геле, проанализирована генетическая структура группировки бычка-песочника в озере Катлабух. Изучены частоты

генотипов и аллелей по локусам тканевых эстераз и миогенов. Показано достоверное отличие между выявленными и ожидаемыми частотами генотипов по полиморфным локусам. Проведен анализ биохимических маркеров и обнаружен полиморфизм для четырех генов.

Ключевые слова: *N. fluviatilis*, бычок-песочник, популяция, генетическая структура, аллели, эстеразы, миогены

V. Zamorov, D. Radionov, I. Khrystoforova, V. Kucherov
Mechnikov National University, Ukraine

BIOCHEMICAL MARKERS POLYMORPHISM OF MONKEY GOBI NEOGOBIUS FLUVIATILIS (PALLAS) IN THE DANUBE LAKE KATLABUH

There is a monkey goby fish in continental Ukrainian waters and Danube lakes. The most numerous species among gobies fishes. Monkey goby is a commercial fish. Therefor the purpose of researching was identification polymorph loci in monkey gobies grouping in Kotlabukh lake.

The material for researching was collected from Kotlabukh lake in Autumn, 2012 by Hydrobiology and General ecology department of Odesa Mechnikov University.

The selection of the spectrum of molecular forms of biochemical markers was carried out in homogenates of muscle tissues of fish. For electrophoretic fractionation of the molecular forms of biochemical markers were used a 6% polyacrylamide gel and a Tris-borate-EDTA buffer system. Identification of molecular forms of enzymes (esterases, LDH, MDG) and myogen in the gel after the end of electrophoretic separation was applied by the method of Korochkin. Less electrophoretically mobile alosime was designated as S (Slow), and more mobile-F (Fast).

A qualitative analysis of the expression of enzymes of the monkey gobies heterolitic system showed that spectrum was characterized by the presence of five major molecular forms of esterases, each of them encoded by various autosomal loci designated by us, according to anodic mobility like Es1-Es5. Electrophoregrams analysis of monkey gobies spectrum of esterases forms revealed the hereditary polymorphism only for locus 2. For this gene-enzyme system, two alosims were found whose mobility was clearly different in the polyacrylamide gel alkaline electrophoresis.

The study of the electrophoretic spectrum of the myogen showed a large number of electromorphs of this form of proteins. The maximum possible number of such genes, according to our data, is 12 for this species. The loci were numbered according to the descending anodic mobility of their gene products by electrophoresis of proteins. Polymorphism was found for loci of myogen 1, 3 and 7. At the same time, the presence of different variants for genes encoding multiple molecular forms of MDH and LDH was not detected.

Thus, it can be concluded that the presence of polymorphism in the grouping of the monkey goby of Lake Kotlabukh is characterized by the genes of esterases and myogen, therefore it is expedient to use these markers in future when analyzing the genetic intraspecies structure of this fish species. An analysis of the genetic structure of the monkey goby grouping in Lake Kotlabukh is carried out. The frequencies of genotypes and alleles at the loci of tissue esterases and myogen have been studied. Comparison of the frequencies of genotypes calculated by Hardy-Weinberg formula at polymorphic loci showed a significant difference between these parameters in the monkey goby grouping at the loci of myogen 7 and esterase 2. At other loci these parameters did not differ significantly.

Observed the genetic structure of monkey gobies grouping by method of alkaline polyacrylamide gel electrophoresis in the lake Katlabuh in 2012. Studied the frequency of genotypes and alleles at loci tissue esterase and miogenes. Shown the significant difference between detected and expected frequencies of genotypes in studying polymorphic loci. Analyzed the biochemical markers and founded polymorphism for four genes.

Key words: *N. fluviatilis*, monkey goby fish, population, genetic structure, alleles, esterase, miogene

Надійшла 03.02.2017