

УДК: 575.174.015.3.597.4/5

Генетическая структура бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) в водоемах Одесского региона

О.В.Кулікова, В.В.Заморов, В.А.Кучеров, Д.Б.Радіонов

Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)
ok.druzenko@gmail.com, bio@onu.edu.ua

Установлено, что популяционно-генетическая структура бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* в водоемах Одесского региона является достаточно гетерогенной. По локусам биохимических маркеров группировка кругляка из Тилигульского лимана существенно отличается от остальных изученных локалитетов. Полученные результаты дают возможность предположить наличие двух различных внутривидовых группировок бычка-кругляка. Одна населяет Тилигульский лиман, другая – объединяет в себе рыб из акватории Одесского залива, о. Змеиный и озера Ялпуг.

Ключевые слова: внутривидовая структура, бычок-кругляк, ферменты, частоты аллелей, аллозимы.

Генетична структура бичка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) у водоймах Одеського регіону

О.В.Кулікова, В.В.Заморов, В.О.Кучеров, Д.Б.Радіонов

Встановлено, що популяційно-генетична структура бичка-кругляка *Neogobius melanostomus* у водоймах Одеського регіону є достатньо гетерогенною. За локусами біохімічних маркерів угруповання кругляка з Тилигульського лиману відрізняється від всіх аналізованих локалітетів. Даний факт дає можливість відмітити наявність двох різних внутрішньовидових угруповань бичка-кругляка. Одна населяє Тилигульський лиман, інша – об'єднує у собі риб з акваторії Одеської затоки, острова Зміїний та озера Ялпуг.

Ключові слова: внутрішньовидова структура, бичок-кругляк, ферменти, частоти алелів, алозими.

The genetic structure of *Neogobius melanostomus* (Pallas) from Odessa region reservoirs

O.V.Kulikova, V.V.Zamorov, V.O.Kucherov, D.B.Radionov

It has been found that the population-genetic structure of round goby *Neogobius melanostomus* in the water bodies of Odessa region is quite heterogeneous. By biochemical markers loci round goby grouping from Tiligul estuary is significantly different from the rest of the studied localities. This fact makes it possible to suggest the presence of two different intraspecific groups of round goby. One inhabits Tiligul estuary, the other combines fish from the waters of the Gulf of Odessa, Island Zmeyniy and Lake Yalpug.

Key words: intraspecific structure, round goby, enzymes, alleles frequencies, allozymes.

Введение

Многолетние исследования внутри- и межвидовой дифференциации рыб с позиций биохимической генетики привели к описанию ряда новых фактов, позволяющих решать многие проблемы рационального использования рыбных ресурсов. Кроме того, результаты многолетних исследований в области популяционной генетики рыб дают возможность сформировать новые подходы к анализу микроэволюционных и адаптационных процессов (Avisе, 2004). Одной из важнейших проблем, решаемых с помощью генетических подходов, является поиск различий между географически разобщенными популяциями (так называемыми локальными стадами), изучение их системной организованности, связанной с генетической подразделенностью на элементарные субпопуляционные единицы в пределах одного биологического вида (Altukhov, 2005).

Однако, несмотря на достигнутые успехи, многие важные вопросы, связанные с изучением популяционно-генетической внутривидовой структуры большого количества важных промысловых рыб, остаются слабо изученными. Так, генетико-биохимические особенности группировок бычка-кругляка *Neogobius melanostomus*, одного из важнейших представителей ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна, остаются практически не изученными. В связи с этим, целью данных

исследований было провести анализ генетической структуры группировок кругляка по локусам биохимических маркеров в акваториях Одесского залива и острова Змеиный, а также озера Ялпуг и лимана Тилигул.

Объекты и методы исследования

В качестве материала для исследований использовали выборки бычков, выловленных весной 2012 г. сетями в акваториях Одесского залива, о. Змеиный, оз. Ялпуг и Тилигульского лимана. В дальнейшем получали экстракты тканей отдельно взятых особей (по 40 экзemplяров из каждого района). Электрофоретическое разделение ферментов проводили в условиях щелочного электрофореза (рН=8,9) в 7% полиакриламидном геле в течение 4 часов при температуре 4°C. Далее определяли наличие биохимических маркеров: лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37), эстераз (3.1.1) и миогенов. Спектр ферментов и миогенов в гелевых блоках выявляли, используя стандартные гистохимические методы (Корочкин и др., 1977; Луппа, 1980). Анализ полученных электрофореграмм проводили с помощью компьютерной денситометрии, используя лицензионную программу «АнаИС». Обозначение локусов проводили в соответствии с современной номенклатурой, при этом разные гены, кодирующие изозимы, обозначали цифрами в соответствии с уменьшением электрофоретической анодной подвижности их генопродуктов (Shaklee et al., 1990). Менее подвижные (при электрофоретическом разделении) аллозимы, кодируемые каждым анализируемым локусом, обозначали как *S* (Slow), а более подвижный аллозим – как *F* (Fast). Соответствующим образом обозначали и аллели. Показатель гетерозиготности (*H*) по локусу рассчитывали как отношение количества гетерозиготных особей ко всей выборке (Тоцкий, 2008). Степень соответствия наблюдаемых частот генотипов теоретически ожидаемым, согласно закону Харди-Вайнберга, проводили с использованием метода χ^2 (Айала, Кайгер, 1988). Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы «Excel» из пакета MS Office.

Результаты и обсуждение

Проведенный нами электрофоретический анализ изозимного спектра β -специфических эстераз из мышечных тканей бычка-кругляка позволил выявить четыре основных зоны активности изучаемых ферментов в полученных полиакриламидных гелях. Молекулярные формы эстераз в каждой из определившихся зон активности, очевидно, являются продуктами различных вариантов отдельных генов, обозначенных нами как *Es1–Es4*. Во второй зоне электрофореграммы (локус *Es2*) характер спектров молекулярных форм изучаемого фермента рыб напоминал картину генетически детерминированного полиморфизма. В трех других зонах, содержащих изозимы эстераз бычка-кругляка, была выявлена лишь количественная изменчивость в их активности, которая достаточно трудно поддается генетической интерпретации. В связи с этим для сравнительного анализа генетической структуры группировок бычка-кругляка, обитающих в разных локальностях (в Одесском заливе, вблизи острова Змеиный и в озере Ялпуг), в дальнейшем в качестве биохимических маркеров наследственного полиморфизма использовались аллозимы, кодируемые локусом *Es2*.

Сравнительный анализ частот *S*-аллелей по исследуемому локусу показал, что во всех четырех группировках бычка-кругляка данный показатель был достоверно ниже, чем аналогичный показатель для *F*-аллеля этого же гена (рис. 1). Достоверных отличий между генетической структурой группировок рыб из Одесского залива, акватории о. Змеиный и оз. Ялпуг по исследуемому локусу найдено не было. В то же время, частота аллеля *Es2-S* у рыб Тилигульского лимана достоверно отличалась от частот, выявленных для бычков из трех остальных локалитетов.

Анализ распределения генотипов по полиморфному локусу *Es2* показал соответствие между выявленными и теоретически ожидаемыми частотами, согласно закону Харди-Вайнберга, у рыб во всех изучаемых нами районах (табл. 1.). Данный факт указывает на то, что исследуемые группировки являются равновесными.

Анализ электрофоретического спектра миогенов у бычка-кругляка выявил большое количество электроморф данной формы белков. Генетический контроль этих белков остается до настоящего времени малоизученным, в связи с чем в популяционных исследованиях часто принимают наиболее подходящую и простую генетическую схему интерпретации результатов электрофоретических исследований: «один ген – одна окрашенная зона геля» (Алтухов и др., 1972). Используя данный подход, можно получить максимальную оценку локусов, кодирующих миогены у исследуемых рыб.

Максимально возможное количество таких генов, согласно нашим данным, у бычка-кругляка равно 16, при этом нумерацию проводили по убыванию анодной подвижности разделяемых при электрофорезе белков. Выявлен полиморфизм для двух исследованных локусов, обозначенных номерами 7 и 11. Частоты аллелей по данным локусам использовались нами для сравнения рыб, обитавших в 4-х исследуемых акваториях. Кроме того, у рыб из лимана Тилигул, полиморфизм, помимо двух выше указанных локусов, был выявлен и для локуса 14 (табл. 2).

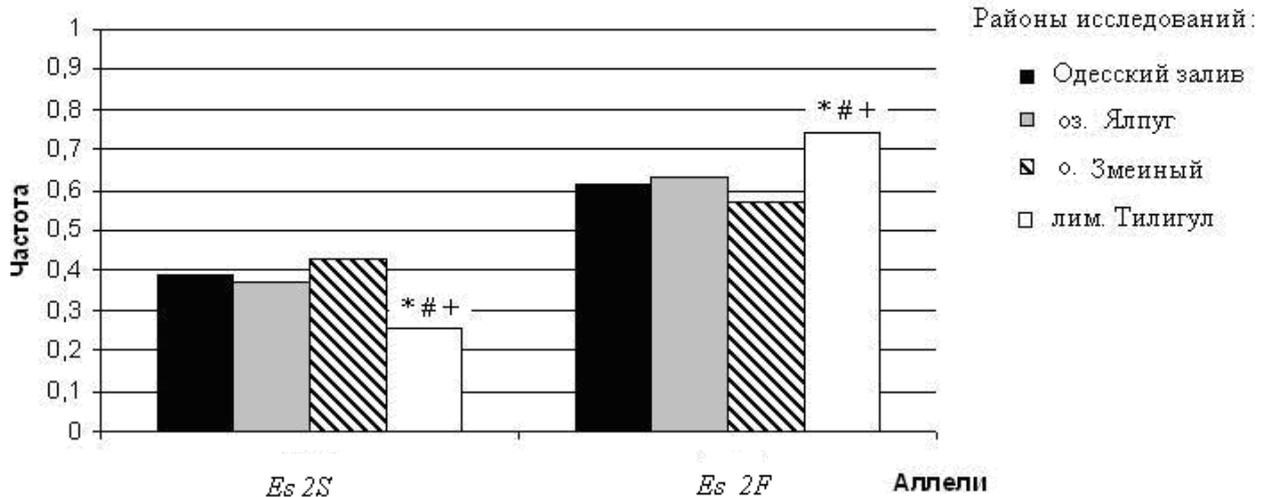


Рис. 1. Частоты аллелей по локусу, кодирующему β -специфическую эстеразу в природных группировках бычка-кругляка. * – достоверное отличие от группировки рыб Одесского залива, # – достоверное отличие от группировки рыб оз. Ялпуг, + – достоверное отличие от группировки рыб о. Змеинный

Таблица 1. Распределение генотипов по полиморфным локусам, кодирующим растворимые мышечные белки в группировках бычка-кругляка из разных акваторий

Генотип	Частота (наблюдаемая)	Частота (ожидаемая)	χ^2
Одесский залив			
S/S	0,19	0,15	0,55
S/F	0,41	0,48	
S/F	0,41	0,37	
о. Змеинный			
S/S	0,10	0,14	1,30
S/F	0,55	0,47	
S/F	0,36	0,40	
оз. Ялпуг			
S/S	0,14	0,18	0,39
S/F	0,57	0,49	
S/F	0,29	0,33	
лим. Тилигул			
S/S	0,06	0,07	0,08
S/F	0,40	0,38	
S/F	0,54	0,55	

Примечание: нулевая гипотеза о равенности частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P=0,05$).

Сравнительный анализ частот S-вариантов полиморфных генов мышечных белков показал, что данный аллель по локусу 7 встречался чаще всего у особей из Одесского залива. По локусу 11 в группировке из озера Ялпуг S-аллель встречался чаще всего (0,81), а среди рыб Одесского залива редко (0,33). Важным фактом является то, что все четыре группировки достоверно отличались между собой по встречаемости вариантов по локусу 7 (рис. 2). По нашему мнению, это свидетельствует о наличии существенной генетической гетерогенности анализируемых групп рыб.

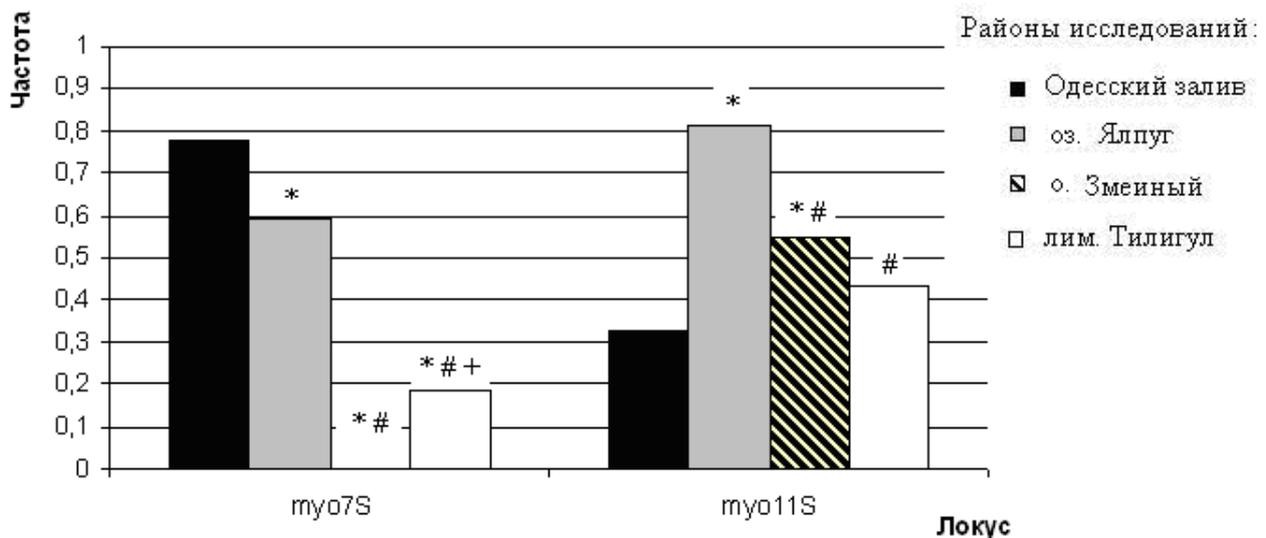


Рис. 2. Частоты аллелей по локусам, кодирующим миогены в природных группировках бычка-кругляка. * – достоверное отличие от рыб Одесского залива, # – достоверное отличие от группировки рыб оз. Ялпуг, + – достоверное отличие от группировки рыб острова Змеиный

Анализ распределения генотипов по полиморфным локусам, кодирующим растворимые мышечные белки, показал совпадение выявленных частот с ожидаемыми (табл. 2). Данный факт подтверждает правомочность нашего предположения о двухаллельном кодировании выделенных нами миогенов, а также позволяет утверждать, что исследуемые группировки бычков являются равновесными.

Изучение генетической структуры кругляка по локусам, кодирующим ЛДГ, при помощи эдлектрофоретического разделения, выявило наличие 5 молекулярных форм данного биохимического маркера в полученных зимограммах. Однако наличие полиморфизма по локусам, кодирующим данный фермент, обнаружено не было и для оценки гетерогенности рыб этот показатель мы не использовали.

Также была проведена количественная оценка изменчивости природных популяций по изученным локусам. Использовали два основных классических показателя: полиморфность (P) и гетерозиготность (H). Результат проведенного анализа показал, что наиболее высокие показатели генетической изменчивости отмечены для локусов, кодирующих различные молекулярные формы эстераз мышц бычка-кругляка (табл. 3). Для локусов миогенов аналогичные показатели были значительно ниже, а для генов, кодирующих субъединицы ЛДГ, полиморфизм не был обнаружен.

Наиболее высокая величина гетерозиготности по всем локусам была отмечена для рыб из Тилигульского лимана (0,088), а наименьшая – у бычков из акватории острова Змеиный (0,050). Основной вклад в формирование указанных отличий между исследуемыми группами рыб внесли миогены. В целом, полученные нами результаты несколько ниже, чем в среднем для представителей костных рыб, т.к. для разных видов этого класса данный показатель колеблется в пределах 0,057–0,110 (Алтухов, 1989; Politov et al., 2000). Согласно доступной нам литературе, следует отметить, что приведенные данные для бычка-кругляка получены впервые и, возможно, являются характерными для этого вида.

Таблица 2.
Распределение генотипов по полиморфным локусам, кодирующим растворимые мышечные белки, в группировках бычка-кругляка из разных акваторий

Генотип	Локус	Частота (наблюдаемая)	Частота (ожидаемая)	χ^2
Одесский залив				
S/S	7	0,63	0,60	0,55
S/F		0,30	0,35	
S/F		0,07	0,05	
S/S	11	0,06	0,11	1,86
S/F		0,54	0,44	
S/F		0,40	0,45	
оз. Ялпуг				
S/S	7	0,38	0,35	0,55
S/F		0,44	0,48	
S/F		0,19	0,17	
S/S	11	0,69	0,66	0,52
S/F		0,25	0,30	
S/F		0,06	0,04	
о. Змеиный				
S/S	11	0,30	0,30	0,02
S/F		0,48	0,50	
S/F		0,21	0,21	
л. Тилигул				
S/S	7	0,08	0,04	2,74
S/F		0,23	0,30	
S/F		0,70	0,66	
S/S	11	0,13	0,19	2,04
S/F		0,61	0,49	
S/F		0,26	0,32	
S/S	14	0,58	0,54	1,31
S/F		0,32	0,39	
S/F		0,11	0,07	

Примечание: нулевая гипотеза о равенности частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P=0,05$).

Показатель полиморфности, который получен для генов, кодирующих исследованные белковые маркеры у рыб из трех акваторий (Одесский залив, о. Змеиный и оз. Ялпуг), был идентичен и составлял 18%, что указывает на полиморфность в генетических структурах разных группировок кругляка. Полученный результат также был несколько ниже, чем у костных рыб, уровень полиморфности у которых колеблется от 11 до 30% (Алтухов и др., 1972). В то же время, для рыб Тилигульского лимана средний уровень полиморфности был выше (0,23), что является следствием наличия в генетической структуре данной группировки одного дополнительного полиморфного локуса (№14), кодирующего миогены. В других проанализированных локалитетах этот локус мономорфен (табл. 2 и 3).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что популяционно-генетическая структура вида бычка-кругляка в исследованном регионе является достаточно гетерогенной. При этом генетическая структура по локусам биохимических маркеров бычков из Тилигульского лимана существенно отличается от остальных изученных локалитетов (по частотам аллелей эстеразы 3 и миогенов, количеству полиморфных локусов миогенов). Учитывая данный факт, а также наличие естественной географической изоляции рыб, можно предположить существование обособленной популяции бычка-кругляка в Тилигульском лимане.

Таблица 3.

Показатели генетической изменчивости исследованных группировок бычка-кругляка из разных акваторий

Показатели генетической изменчивости	Одесский залив	о. Змеиный	оз. Ялпуг	лим. Тилигул
Эстеразы				
Полиморфные локусы	2	2	2	2
Мономорфные локусы	2	2	2	2
P (полиморфность)	0,5	0,5	0,5	0,5
H (гетерозиготность)	0,238	0,233	0,245	0,21
ЛДГ				
Полиморфные локусы	0	0	0	0
Мономорфные локусы	2	2	2	2
P (полиморфность)	0	0	0	0
H (гетерозиготность)	0	0	0	0
Миогены				
Полиморфные локусы	2	2	2	3
Мономорфные локусы	14	14	14	13
P (полиморфность)	0,13	0,13	0,13	0,19
H (гетерозиготность)	0,052	0,030	0,043	0,055
Все локусы				
Полиморфные локусы	4	4	4	5
Мономорфные локусы	18	18	18	17
P (полиморфность)	0,18	0,18	0,18	0,23
H (гетерозиготность)	0,069	0,050	0,062	0,088

Список литературы

- Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. – М.: Мир, 1988. – Т.3. – 368с.
 Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1989. – 328с.
 Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. и др. О числе мономорфных и полиморфных локусов в популяции кеты – одного из тетраплоидных видов тихоокеанских лососей // Генетика. – 1972. – Т.8, №2. – С. 251–259.
 Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275с.
 Луппа Х. Основы гистохимии. – М.: Мир, 1980. – 344с.
 Тоцький В. М. Генетика. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712с.
 Altukhov Yu.P. Intraspecific genetic diversity: monitoring, conservation and management. – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2005. – 438p.
 Avise C.J. Molecular markers, natural history and evolution. – Sanderland, Massachusetts: Sinauer Ass. Inc., 2004. – 640p.
 Politov D.V., Gordon N.Yu., Afanasiev K.I. et al. Identification of Palearctic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic markers // J. Fish Biol. – 2000. – Vol.57, Suppl.A. – P. 51–71.
 Shaklee J.B., Allendorf F.W., Morizot D.C. Whitt G.S. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish // Transaction Amer. Fish. Soc. – 1990. – Vol.119. – P. 2–15.

Представлено: Н.Д.Хаустова / Presented by: N.D.Khaustova

Рецензент: Д.А.Шабанов / Reviewer: D.A.Shabanov

Подано до редакції / Received: 01.04.2014