

В. В. Заморов, Д. Б. Радионов

ПОЛИМОРФИЗМ ПО ЛОКУСАМ β -ЭСТЕРАЗ БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* ОДЕССКОГО ЗАЛИВА И АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

Проанализирована генетическая структура групп бычка-кругляка, обитающих в Одесском заливе и акватории о. Змеиный по локусам, кодирующим β -эстеразы. Показано наличие у исследуемых рыб четырех молекулярных форм фермента. Изучены полиморфизм и изменение частоты аллелей по локусам, кодирующим изозимы эстераз 1 и 2. Высказано предположение о принадлежности рыб из двух исследуемых акваторий к разным внутривидовым группам.

Ключевые слова: *Neogobius melanostomus*, эстеразы, молекулярные формы ферментов, полиморфизм, частота аллелей.

Применение методов биохимической генетики, в частности электрофоретических методов исследования белковых систем, позволяет качественно и количественно описать генетическое разнообразие природных популяций, определить степень внутривидовой и внутривидовой дифференциации, а также изучить структуру, динамику и адаптационные возможности популяций рыб [5, 11, 12, 18]. Исследование множественных молекулярных форм ферментов дает возможность оценить не только особенности генома отдельной особи, но и качество генофонда популяций и вида. Результаты таких исследований в сочетании с другими подходами позволяют определить уровень внутривидовой изменчивости, реконструировать историю формирования современной ихтиофауны, а также могут быть применены для мониторинга природных популяций при разработке мероприятий по охране их генофонда, восстановлению и рациональному использованию [16, 19].

Применение эстераз в качестве молекулярных маркеров для исследования полиморфизма популяций разных видов животных связано с возможностью одновременно изучать экспрессию нескольких генов, контролирующих синтез изоформ, осуществлять видовую и популяционную идентификацию и анализировать генетическую гетерогенность популяций [3, 10, 12, 13].

© В. В. Заморов, Д. Б. Радионов, 2014

Под названием «эстеразы» объединяют группу ферментов, общим свойством которых является возможность расщеплять эфирные связи карбоновых кислот с нафтолом. У рыб эстеразы чаще всего являются продуктами нескольких локусов, большинство из которых характеризуется высоким уровнем полиморфизма, что в сочетании с относительно простыми методами их гистохимического выявления позволяет этим ген-энзимным системам быть удобным инструментом в изучении и сравнении генетической структуры популяций рыб [12].

Из рыб, обитающих в Черном море, бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas) вызывает особый интерес. Он играет важную роль в донных прибрежных биоценозах, а благодаря способности переносить широкий диапазон солености встречается в море и пресных водоемах [15]. Освоение новых акваторий может сопровождаться изменением морфо-биологических параметров: темпа роста, особенностей размножения, размерно-возрастных характеристик и др. [8]. В этой связи особое значение приобретают исследования групп рыб, обитающих в разных экологических условиях. Акватория Одесского залива находится под достаточно сильным воздействием антропогенных факторов. Прибрежная зона о. Змеиный отличается разнообразием условий существования, богатством флоры и фауны, а также незначительным влиянием человека на морскую экосистему. Популяционная структура и генетико-биохимическая характеристика групп бычка-кругляка в Азово-Черноморском бассейне практически не изучены, что не позволяет дать объективную оценку внутривидовому таксономическому статусу существующих экологических форм. Исследование генетического полиморфизма популяций бычка-кругляка с использованием эстераз в качестве маркеров, в совокупности с данными по его биологии и экологии, позволит приблизиться к раскрытию механизмов адаптации вида, провести объективное определение его запасов и организовать рациональный промысел. Таким образом, исследование популяционной организации бычка-кругляка по локусам, кодирующим различные биохимические маркеры, не только представляет фундаментальный научный интерес, но имеет и прикладное значение.

Целью данной работы было изучение генетической структуры экологических групп бычка-кругляка из разных участков акватории северо-западной части Черного моря по локусам эстераз.

Материал и методика исследований. Материалом для исследований послужили самцы бычка-кругляка, выловленные сетями в летне-осенний период с 2008 по 2010 год в Одесском заливе (183 особи) и акватории о. Змеиный (173 особи). По численности в уловах доминировали двух- и трехгодовики, их доля составляла 70—90%.

Исследования электрофоретических спектров эстераз проводили на тканях жаберных лепестков каждой особи в отдельности. Возраст рыб определяли по отолитам. Выловленных рыб, по 30 — 35 особей для каждого анализа, замораживали и хранили при температуре —20°C. Перед экспериментом материал дефростировали, выделяли жабры и гомогенизировали их в 0,1 М глицин-NaOH буфере (pH 9,0), который содержал Тритон X-100 в конечной

концентрации 1%. Приготовленные гомогенаты центрифугировали, полученный супернатант использовали для электрофоретического разделения эстераз. Электрофорез ферментов проводили в 7%-ном полиакриламидном геле по методике [23].

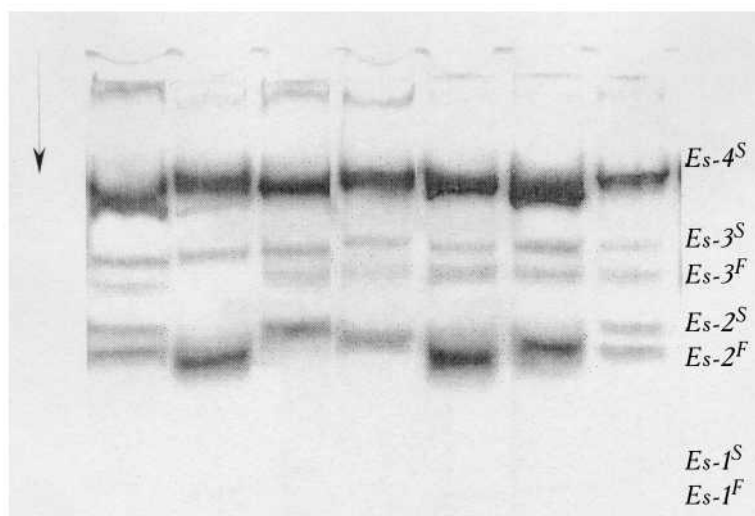
Для выявления молекулярных форм эстераз применяли методику Л. И. Корочкина [14] с модификациями [10]. С целью выявления зон локализации эстераз в геле, ферментативную реакцию проводили в присутствии диазония синего прочного RR [6]. Количественную оценку электрофореграмм осуществляли при помощи специальной лицензионной компьютерной программы «АнаИС». Интерпретацию полученных аллозимных спектров проводили классическими методами [14, 19]. Менее электрофоретически подвижный аллозим по каждому локусу обозначали как *S* (*Slow*), а более подвижный — как *F* (*Fast*). Полученные цифровые данные, отражающие уровень активности исследованных ферментов, обрабатывали статистически [4] с помощью программы «Excel» из пакета MS Office. Для расчета частоты соответствующих генов и генотипов в выборках рыб использовали формулу Харди-Вайнберга [21]. Степень соответствия наблюдаемых и теоретически ожидаемых частот генотипов проводили с использованием метода χ^2 [1]. Показатель гетерозиготности (*H*) по локусам высчитывали как отношение количества гетерозиготных особей ко всей выборке [21].

Результаты исследований и их обсуждение

В электрофоретическом спектре тканевых эстераз бычка-кругляка, обитающего в акваториях Одесского залива и о. Змеиный, обнаружено четыре основные зоны активности, вероятно кодируемые разными аутосомными локусами. Они были обозначены как *Es1* — *Es4* по убыванию анодной подвижности в геле (рис. 1). Полученные данные подтверждают описанные ранее результаты, согласно которым для черноморских бычков характерно наличие четырех зон с эстеразной активностью [7]. Наибольший уровень полиморфизма в изученных группах был характерен для локусов *Es2* и *Es1*. Анализ электрофореграмм позволил предположить наличие S- и F-аллелей, кодирующих соответствующие аллозимы в каждом из указанных локусов. В то же время выраженного полиморфизма по локусам *Es3* и *Es4* в анализируемых выборках обнаружено не было. В связи с этим, временную и пространственную динамику генетической структуры групп бычка-кругляка изучали по локусам *Es1* и *Es2*.

Динамика частот S-аллелей по локусу, кодирующему эстеразу 2 у бычков, выловленных в Одесском заливе в 2008 и 2009 гг., почти не различалась и достигала соответственно 0,70 и 0,81, в 2010 г. этот показатель значительно снизился. В то же время с 2009 по 2010 г. встречаемость S-аллеля гена эстеразы 1 достоверно возросла (рис. 2).

Динамика частоты аллеля, кодирующего S-аллозим эстеразы 1 у рыб, обитающих вблизи о. Змеиный, в течение трех лет не имела четкой тенденции. С 2008 по 2009 г. встречаемость аллеля достоверно возросла с 0,36 до 0,70, а в 2010 г. снизилась до 0,46 (см. рис. 2). Частота S-аллеля локуса *Es2* этой группы с 2009 по 2010 г. также снизилась с 0,45 до 0,36.



1. Электрофоретические спектры эстераз бычка-кругляка.

Сравнительный анализ динамики частоты аллелей в двух исследованных группах показал, что в период 2009—2010 гг. у рыб в Одесском заливе частота аллеля, кодирующего медленную электроморфу эстеразы 1, повысилась, а у бычков из акватории о. Змеиный — наоборот, снизилась. Это может указывать на генетическую гетерогенность стад рыб, обитающих в морской акватории Дунай-Днестровского междуречья.

В 2009 г. существенных различий частот 5-аллелей по локусу *Es1* между группами бычка-кругляка, обитавшими в Одесском заливе и вблизи о. Змеиный, обнаружено не было. В то же время в 2010 г. встречаемость этого аллеля в Одесском заливе была значительно выше (рис. 3). Данные, полученные для локуса *Es2*, указывают на то, что в течение 2009 и 2010 г. частота аллеля, кодирующего медленную электроморфу фермента, была достоверно выше у рыб из Одесского залива. Достоверные различия частот изученных локусов позволяют предположить, что популяция бычка-кругляка в исследуемом регионе Черного моря имеет сложную гетерогенную структуру, по крайней мере состоящую из частично изолированных групп рыб.

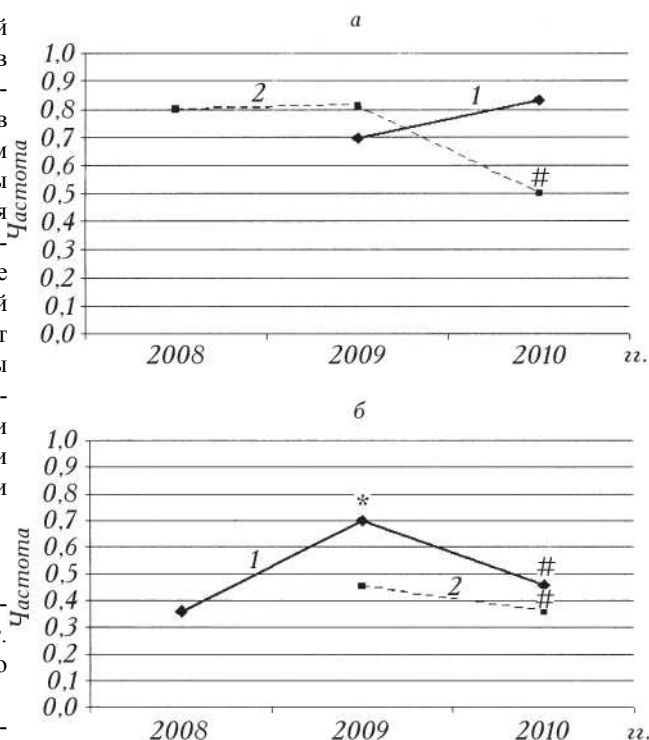
Анализ частоты генотипов по локусам, кодирующим множественные молекулярные формы эстераз у рыб из Одесского залива, показал, что наблюдаемые частоты по генам *Es1* и *Es2* в течение всего периода исследований практически всегда соответствовали ожидаемым согласно закону Харди-Вайнберга, за исключением генотипа по локусу *Es2* в 2009 г., когда наблюдаемая частота гетерозигот была более чем втрое ниже ожидаемой (табл. 1). Аналогичный анализ генотипов у бычков, обитающих вблизи о. Змеиный, выявил достоверное превышение ожидаемых частот по сравнению с наблюдаемыми только по гену *Es1* в 2010 г. (см. табл. 1). В остальные годы достоверных различий между ожидаемой и наблюдаемой частотой обнаружено не было.

В целом сравнительный анализ указывает на то, что в исследуемых группах бычков-кругляков частота генотипов по локусам, кодирующим множественные формы эстераз, распределяется согласно закону Харди-Вайнберга. Достоверные отклонения наблюдаемой встречаемости генотипов от ожидаемой в отдельные годы могут быть связаны со случайными процессами (дрейфом генов или миграциями), не имеющими системного характера.

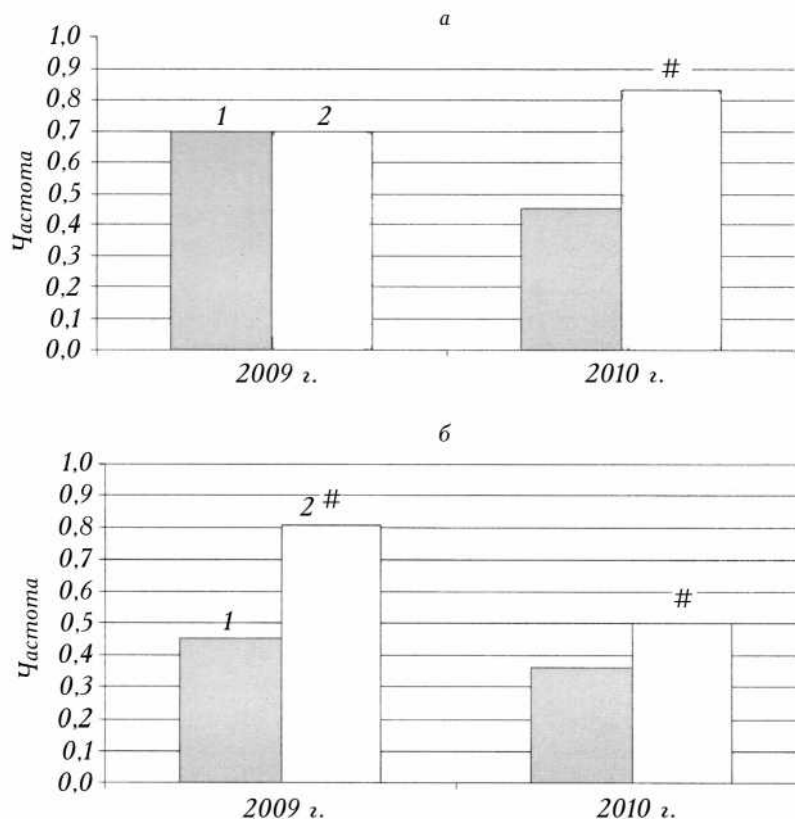
Сравнительный анализ уровня гетерозиготности в 2008—2010 гг. (табл. 2) показал, что генетическая изменчивость полиморфных локусов *Es1* и *Es2* была значительно выше у рыб, обитавших вблизи о. Змеиный (коэффициент гетерозиготности равен

соответственно 0,53 и 0,51), чем у рыб из Одесского залива (соответственно 0,30 и 0,19). В среднем, коэффициент гетерозиготности по четырем локусам, кодирующим множественные формы эстераз бычка-кругляка из Одесского залива в течение трех лет составлял 0,12 и из района о. Змеиный — 0,27 (см. табл. 2). Поскольку средний уровень гетерозиготности у рыб составляет 0,12 [2], а по наиболее полиморфным генам этот показатель колеблется в пределах 0,28—0,48 [20], полученные значения указывают на довольно высокий уровень генетической гетерогенности рыб, обитающих вблизи о. Змеиный. Это позволяет предположить, что адаптационный потенциал у этой группы значительно выше, чем у группы из Одесского залива.

Также была проанализирована динамика частот аллелей по локусу *Es2* у бычков разных возрастных групп исследованных местообитаний. В Одесском заливе достоверное различие по анализируемому маркеру выявлено у двухгодовиков в 2009 г. и трехгодовиков в 2010 г. (рис. 4). Известно, что бычок-кругляк является малоподвижным видом и лишь на период зимовки совершает значительные перемещения, уходя дальше от берега на большие глубины [22]. Полученные результаты позволяют предположить, что после зимовки бычки возвращаются приблизительно в тот же район, откуда они



2. Динамика частоты S-аллелей по локусам *Es1* (1) и *Es2* (2) в группах бычка-кругляка из Одесского залива (а) и о. Змеиный (б). * отличия по сравнению с 2008 г. достоверны ($p = 0,05$), # отличия по сравнению с 2009 г. достоверны ($p = 0,05$).



3. Частота встречаемости S-аллеля по локусу *Es1* (а) и *Es2* (б) в природных группах бычка кругляка из акватории о. Змеиный (1) и Одесского залива (2); # различия частоты аллелей достоверны ($p = 0,05$).

мигрировали осенью предыдущего года. Возможно, активные перемещения вдоль морского побережья бычок-кругляк совершает с весны по осень, когда ищет места для нереста и нагула. Подобные миграции затрагивают в первую очередь особей одной генерации. Данное предположение подтверждается тем, что рыбы одного возраста, выловленные на отдельном участке акватории Одесского залива в 2009 и 2010 гг., т. е. принадлежащие к разным генерациям, достоверно различались между собой по исследованному показателю (см. рис. 2 и 4).

Для группы бычка-кругляка акватории о. Змеиный достоверных изменений частоты S-аллеля локуса *Es2* у особей одного поколения за весь анализируемый период обнаружено не было (см. рис. 4). Наиболее вероятно, что рыбы в возрасте 2+ и 3+ , вылавливаемые на протяжении двух лет в прибрежной зоне острова, принадлежат к одной генерации. Динамика генетической структуры по локусу *Es2* разновозрастных групп бычка-кругляка этой акватории является ожидаемой, учитывая биологические особенности вида и географическое расположение острова. Бычок-кругляк предпочитает каменистый субстрат, который расположен локально на небольшой площади в прибрежной зоне. На удалении более 300 м от берега остров окружен

1. Частота встречаемости генотипов по локусам, кодирующим эстеразы 1 и 2 в группах бычка-кругляка из Одесского залива и акватории о. Змеиный

Генотипы	Частота		χ^2
	наблюдаемая	ожидаемая	
Одесский залив			
2008			
<i>Es2^S / Es2^S</i>	0,70	0,64	1,41
<i>Es2^S / Es2^F</i>	0,20	0,32	
<i>Es2^F / Es2^F</i>	0,10	0,04	
2009			
<i>Es1^S / Es1^S</i>	0,52	0,49	10,03*
<i>Es1^S / Es1^F</i>	0,36	0,42	
<i>Es1^F / Es1^F</i>	0,12	0,09	
<i>Es2^S / Es2^S</i>	0,76	0,66	
<i>Es2^S / Es2^F</i>	0,10	0,31	
<i>Es2^F / Es2^F</i>	0,14	0,04	
2010			
<i>Es1^S / Es1^S</i>	0,71	0,69	0,43
<i>Es1^S / Es1^F</i>	0,24	0,28	
<i>Es1^F / Es1^F</i>	0,05	0,03	
<i>Es2^S / Es2^S</i>	0,35	0,25	2,88
<i>Es2^S / Es2^F</i>	0,29	0,50	
<i>Es2^F / Es2^F</i>	0,35	0,25	
Остров Змеиный			
2008			
<i>Es1^S / Es1^S</i>	0,11	0,13	0,13
<i>Es1^S / Es1^F</i>	0,50	0,46	
<i>Es1^F / Es1^F</i>	0,39	0,41	
2009			
<i>Es1^S / Es1^S</i>	0,49	0,49	0,01
<i>Es1^S / Es1^F</i>	0,43	0,43	
<i>Es1^F / Es1^F</i>	0,09	0,09	
<i>Es2^S / Es2^S</i>	0,22	0,21	0,09
<i>Es2^S / Es2^F</i>	0,47	0,50	
<i>Es2^F / Es2^F</i>	0,31	0,30	

Предложение табл. 1

Генотипы	Частота		χ^2
	наблюдаемая	ожидаемая	
2010			
$Es1^S / Es1^S$	0,13	0,21	5,79*
$Es1^S / Es1^F$	0,64	0,50	
$Es1^F / Es1^F$	0,22	0,30	
$Es2^S / Es2^S$	0,19	0,22	1,01
$Es2^S / Es2^F$	0,56	0,50	
$Es2^F / Es2^F$	0,26	0,29	

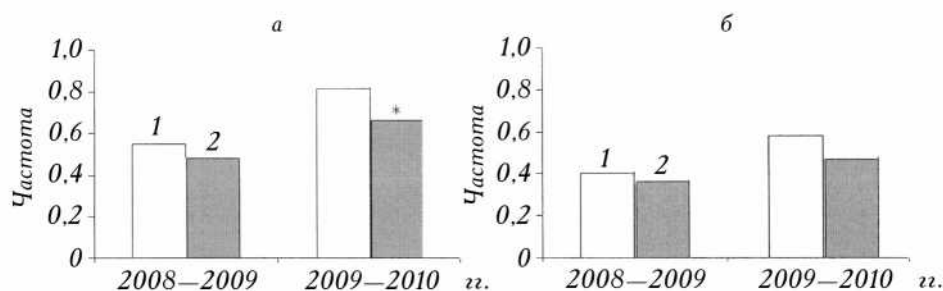
* Нулевая гипотеза о равенности частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($p = 0,05$), $n = 30$.

2. Гетерозиготность (H) локусов, кодирующих множественные молекулярные формы эстераз в группах бычка-кругляка из Одесского залива и акватории о. Змеиный

Локусы	Одесский залив	о. Змеиный
$Es1$	0,30	0,53
$Es2$	0,19	0,51
$Es3$	0,00	0,00
$Es4$	0,00	0,00
Среднее значение H по четырем локусам	0,12	0,26

мягкими грунтами, образованными песком, ракушей и илом, этот субстрат неблагоприятен для размножения весной и нагула в летне-осенний период, что заставляет бычка-кругляка образовывать скопления среди валунов и глыб в прибрежной акватории в течение почти всего года [9, 17]. Таким образом, можно предположить, что возле острова находится локальная внутривидовая группа, которая постоянно обновляется новыми особями из близкорасположенных районов шельфа. Основой этой группы являются рыбы, родившиеся в акватории острова, что подтверждается достоверным сходством по исследованным параметрам одной генерации в течение нескольких лет исследований.

Таким образом, изменение частоты аллелей у рыб, обитающих в акватории о. Змеиный, обусловлено различиями между генерациями, в то время как особи одной генерации в разные годы достоверно не различались. В группах бычка-кругляка из Одесского залива в отдельные годы обнаружены изменения встречаемости разных вариантов генов по локусу $Es2$ в пределах одного поколения. Вероятно, это указывает на то, что население бычка-кругляка в Одесском заливе представляет собой в большей степени гетерогенную внутривидовую группу, что обусловлено активными миграциями



4. Динамика частоты S-аллелей по локусу *Es2* в возрастных группах бычка-кругляка из Одесского залива (а) и акватории о. Змеиный (б): 1 — возраст 2+; 2 — возраст 3+; * различия по сравнению с предыдущим годом достоверны ($p = 0,05$).

вдоль побережья и, как следствие, интенсивным перемешиванием локальных скоплений рыб. Обнаруженная генетическая гетерогенность по локусам эстераз дает возможность предположить, что изучаемые группы рыб из Одесского залива и акватории о. Змеиный могут относиться к разным популяциям.

Заключение

Тканевые эстеразы бычка-кругляка кодируются четырьмя локусами. Наличием полиморфизма характеризуются гены *Es1* и *Es2*.

Группы бычка-кругляка, обитающие в двух разных акваториях северо-западной части Черного моря на протяжении трех лет исследований достоверно различались частотой аллелей по локусу эстеразы 2. Это указывает на наличие гетерогенности в популяционной структуре вида в исследуемом регионе.

**

Проаналізовано генетичну структуру груп бычка-кругляка, з Одеської затоки та акваторії о. Зміїний за локусами, які кодують β -естерази. Показано наявність чотирьох груп молекулярних форм ферменту у досліджених риб. Вивчено поліморфізм і зміну частоти алелів за двома локусами, що кодують естерази 1 і 2. Зроблено припущення щодо належності досліджених риб до різних внутрішньовидових груп.

**

The genetic structure of loci encoding β -esterase of the round goby groups inhabiting the Odessa Bay and coastal zone of the Zmeinyy Island were analyzed. Four groups of the molecular enzyme forms were identified. The polymorphism and allele frequencies of two loci, coding esterase isozymes 1 and 2 were studied. The assumption was made that the considered fish belong to two different intraspecies groups.

**

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. — М.: Мир, 1988. — Т. 3. — 368 с.
2. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А., Омельченко В. Т. и др. О числе мономорфных и полиморфных локусов в популяции кеты *Oncorhynchus keta* Walb. — одного из тетраплоидных видов лососевых // Генетика. — 1972. — Т. 8, № 2. — С. 67—75.
3. Алферова Н. М., Нефедов Г. Н. Электрофоретическое исследование эстераз некоторых видов рыб Восточной Атлантики // Биохимическая генетика рыб: Материалы 1-го Всесоюз. совещ., Ленинград, 6—9 февр. 1973 г. — Л., 1973. — С. 195—199.
4. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. — Харків: Харк. нац. ун-т ім. В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
5. Барминцев В. А. Применение молекулярно-биологических методов при формировании ремонтно-маточных стад осетровых рыб // Тез. докл. 1-й науч.-практ. конф. «Проблемы современного товарного осетроводства», Астрахань, 24—25 марта, 1999 г. — Астрахань, 1999. — С. 69—71.
6. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 464 с.
7. Доброволов И. С., Пинчук В. И. Генетическая дивергенция черноморских видов бычков группы *Ponticola*, оцененная по биохимическим генным маркерам // Вестн. зоологии. — 1993. — № 2. — С. 58—63.
8. Заморов В. В., Олейник Ю. Н., Джуртубаев М. М. Естественное вселение бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) в придунайские озера // Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Біологія. — 2005. — Т. 10, вип. 5. — С. 93—100.
9. Заморов В. В., Снигирев С. М., Куракин А. П., Олейник Ю. Н. Видовой состав и распределение рыб в районе острова Змеиный // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. — 2005. — Вып. 12. — С. 593—602.
10. Заморов В. В., Рижко І. Л., Друзенко О. В. Поліморфізм естераз бичка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) з акваторії острова Зміїний // Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Біологія. — 2010. — Т. 15, вип. 17. — С. 73—81.
11. Зенкин В. С. Биохимический полиморфизм и популяционно-генетический анализ атлантической сельди (*Clupea harengus* H.) // Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. — Л., 1979. — С. 64—68.
12. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб. — Л.: Наука, 1987. — 520 с.
13. Корешкова Н. Д., Паюсова А. Н. Популяционная структура рыбца (*Vimba vimba*), выявленная на основании электрофоретического анализа мышечных эстераз // Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. — Л., 1979. — С. 116—118.
14. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
15. Манило Л. Г. Особенности распределения бычковых рыб (Actinopterygii, Perciformes) Азово-Черноморского бассейна в зависимости от солености // Вестн. зоологии. — 2001. — Т. 45, № 3. — С. 231—240.

16. Махоткин М. А. Биологический полиморфизм пеленгаса *Mugil soiuu* Bas. Азовского моря // Тез. докл. Всерос. конф. молодых ученых, посвящ. 140-летию со дня рождения Н. М. Книповича. — Мурманск, 2002. — С. 133—134.
17. Острів Зміїний. Екосистема прибережних вод / За ред. В. А. Сминтини, В. О. Іваниці, В. І. Медінця. — Одеса: Астропринт, 2008. — Т. 2. — 235 с.
18. Павлов С. Д. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция тихоокеанских форелей (род *Parasalmo*) западной Камчатки // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 9. — С. 1251—1261.
19. Пуговкин А. И. Использование аллозимных данных для оценки генетического сходства // Биохимическая и популяционная генетика рыб / Под ред. В. С. Кирпичникова. — Л., 1979. — С. 10—17.
20. Пустовойт С. П. Генетическая изменчивость малочисленной популяции нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) р. Ола (северное побережье Охотского моря) // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 12. — С. 1657—1662.
21. Тоцький В. М. Генетика. — Одеса: Астропринт, 2008. — 712 с.
22. Фауна Украины. Т. 8. Рыбы. Вып. 5. Окунеобразные, скорпенообразные, камбалообразные, присоскопорообразные, удильщикообразные / А. И. Смирнов. — Киев: Наук. думка, 1986. — 318 с.
23. Davis B. J. Disk electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.