

УДК 575.17:597.556.333.1(477.74)(26.05)

О. В. КУЛКОВА, В. В. ЗАМОРОВ, В. О. КУЧЕРОВ, Д. Б. РАДІОНОВ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Шампанський пров., 2, Одеса, 65058, Україна

ДИНАМІКА ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ УГРУПОВАННЯ БИЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIVUS MELANOSTOMUS* В ТИЛІГУЛЬСЬКОМУ ЛИМАНІ ЗА ЛОКУСАМИ ЕСТЕРАЗ

Проведені дослідження та аналіз динаміки генетичної структури угруповання бичка-кругляка Тилігульського лиману за локусом водорозчинних м'язових естераз. Виявлено кількість молекулярних форм цього ферменту та локусів, які їх кодують у дослідженій групі риб. Визначені мономорфні та поліморфні локуси естераз. Виявлені значні зміни частоти алелів та генотипів за поліморфними локусами у угрупованні бичка-кругляка з Тилігульського лиману протягом всього періоду досліджень. Динаміка генетичної структури угруповання бичка-кругляка дозволяє припустити міграцію риб з інших локалітетів.

Ключові слова: *Neogobius melanostomus*, естерази, молекулярні форми ферментів, поліморфізм, частоти алелів та генотипів

Методи біохімічної генетики дозволяють виявляти алейну мінливість у видів, для яких гібридологічний аналіз є практично не придатним. Наприклад, такими організмами є багато видів риб, більшість з яких мають важливе промислове значення і відіграють істотну роль у функціонуванні екологічних систем прісноводних і морських водойм. У зв'язку з цим, алозимний аналіз природних популяцій є одним із важливіших інструментів у вивченні генетичної структури угруповань живих організмів. Суть даного підходу полягає в тому, що виявляються алозими ферменту, які розглядаються як маркери різних варіантів гена, що їх кодує. Електрофоретичне визначення таких біохімічних маркерів застосовується як один з основних методів виявлення алейної різноманітності в сучасних дослідженнях популяцій [1, 7].

Особливої актуальності зараз набуває вивчення ресурсів водойм північно-західного Причорномор'я, окреме місце серед них займає Тилігульський лиман. Для його акваторії характерне досить інтенсивне рибальство, в тому числі проведення лову представників родини бичкових риб. Значна антропогенна трансформація гідроекосистеми лиману істотно впливає на склад його іхтіофауни. Тилігульський лиман внесений до міжнародного списку водойм Рамсарської конвенції про захист водно-болотних угідь, тому моніторинг за його іхтіоценозом в цілому, і деякими найбільш численними видами окремо, є важливим аспектом екологічних досліджень в даному регіоні [4].

Об'єктом для проведення цієї роботи було обрано бичка-кругляка, який є одним з таких видів, який активно почав розповсюджуватися наприкінці минулого віку в водойми Європи і світу. Крім того, експансія кругляка за останні 20 років охопила багато водойм за межами його звичного ареалу (Північна Америка, Балтійське море).

У зв'язку з цим, метою роботи було вивчення динаміки частот молекулярних форм естераз бичка-кругляка з Тилігульського лиману.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом для досліджень були обрані особини бичка-кругляка, виловлені у весняно-осінній період з 2010 до 2013 рр. у Тилігульському лимані. Відбиралися м'язові тканини бичків, що було використано для виявлення спектру молекулярних форм естераз. Для електрофоретичного фракціонування водорозчинних естераз використовували 6% поліакриламідний гель (ПААГ) і буферну систему – трис-борат-ЕДТА (ТЕБ). Електрофорез проводили в системі вертикального пластинчатого гелю (розміри 140×120×1 мм) за допомогою апарату VE4 (Росія). З метою виявлення молекулярних форм естераз в гелі після припинення електрофоретичного розділення

застосовували методику Л. І. Корочкіна [6]. Для виявлення зон локалізації естераз в гелі, ферментативну реакцію проводили в присутності діазонія-синього RR.

Інтерпретацію отриманих алозимних спектрів проводили класичними методами [3]. Для розрахунку частот відповідних генів і генотипів у вибірках риб використовували формулу Харді-Вайнберга [7]. Ступінь відповідності спостережуваних частот генотипів до теоретично очікуваних проводили з використанням методу χ^2 [3].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті електрофоретичного дослідження у особин бичка-кругляка виявлено спектр тканинних естераз, в межах якого виділили наявність чотирьох основних зон активності β -специфічних естераз. Молекулярні форми ферменту кожної з цих зон, найбільш вірогідно, кодуються власним аутосомним локусом. Ці локуси були позначені як **Es1 – Es4**, при цьому нумерацію проводили за зниженням анодної рухливості білків під час електрофоретичного розділення. Запропоновані назви і принцип нумерації локусів є загальноприйнятим і часто використовується в роботах, які присвячені популяційно-генетичним дослідженням риб [2]. Слід зазначити, що виявлена кількість генів, що кодують множинні молекулярні форми розчинних м'язових β -естераз бичка-кругляка відповідають результатам отриманим раніше для групувань цього виду риб, які мешкали в інших локалітетах [5]. Аналіз електрофореграм зі спектром форм естераз бичків, вилонених у 2010 р. в Тилігульському лимані дозволив виявити наявність спадкового поліморфізму (присутність у спектрі двох алозимів, частота яких вище 0,05) тільки для локусу 2 (рис. 1). Було виявлено два алозими, рухливість яких чітко розрізнялася в поліакриламідному гелі в умовах лужного електрофорезу. Відповідно до міжнародних правил генетичної номенклатури [2], найбільш рухливий алозим (і, відповідно, алель, який його кодує) були позначені нами, як F-варіант, а менш рухливий алозим його варіант гена, що його кодує, як S. За іншими локусами у 2010 р. поліморфізму виявлено не було. У зв'язку з цим подальший аналіз часової динаміки генетичної структури угруповання бичка-кругляка в Тилігульському лимані проводили переважно за локусом 2.

На початку проаналізованого періоду частота S-алелю гена естерази 2 серед риб Тилігульського лиману становила мінімальне значення за увесь час проведеного дослідження – 0,26. Навесні 2011 р. виявлено значне підвищення досліджуваного показника генетичного поліморфізму до 0,78. У цьому сезоні зустрічальність алелю S була вже значно вище, ніж алелю, що кодує більш рухливий варіант β -специфічної естерази м'язів бичків (рис. 1). Після цього частота S-варіанта гена стала дещо меншою восени 2011 р. (0,62) і значно знизилася навесні 2012 р. (0,25). Восени 2012 р. спостерігали знову збільшення частоти (0,54), після чого істотних змін у 2013 р. не відбувалося: навесні частота алелю Es2-S становила 0,61, а восени – 0,55 (рис. 1).

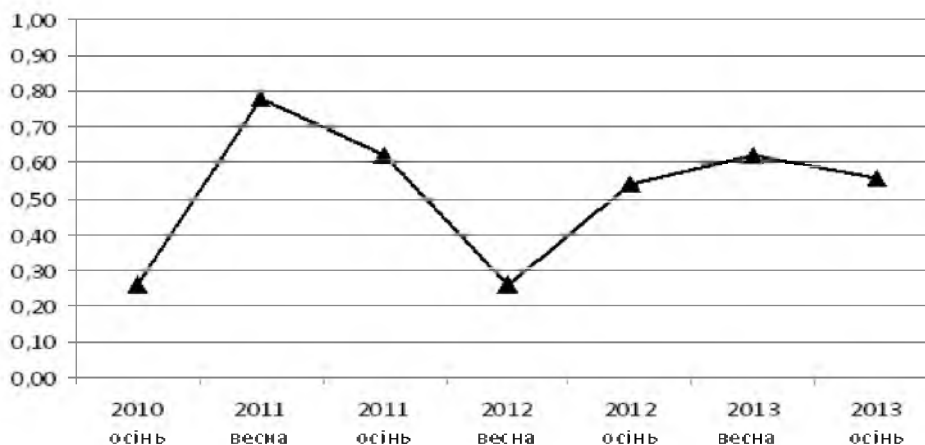


Рис.1. Динаміка частоти S-алелю за локусом естерази 2 в групуванні бичка-кругляка Тилігульського лиману

Примітка. По вертикалі – частоти алелю, по горизонталі – періоду досліджень; n = 40.

Також було проведено аналіз середніх величин частот алелів, розрахованих для кожного окремого року досліджень (рис. 2). Мінімальне значення частоти S-алелів естерази 2 в групуванні бичка-кругляка Тилігульського лиману спостерігали у 2010 р. Водночас у 2011 р. ця частота була максимальною за весь період досліджень і становила 0,70. У 2012 р. частота цього варіанта гену достовірно знизилася (0,40), а у 2013 р. знову збільшилася – 0,59 (рис. 2).

Починаючи з осені 2012 р. виявлено поліморфізм за локусом естерази 3, який був відсутній в угрупованнях риб 2010-2011 рр. (частота S-алелю досягала 1,00). Однак у 2012 р. частота цього показника, за рахунок появи в генетичній структурі угруповання варіанта гену, що кодує більш рухливу форму естерази 3, знизилася до 0,69. На появу генетичного та біохімічного поліморфізму могла вплинути ймовірна наявність міграцій бичків в Тилігульський лиман з інших акваторій північно-західної частини Чорного моря. Це може зробити більш різноманітною генетичну структуру популяції, що посилить її стійкість до різких змін умов існування. У 2013 р., зустрічальність варіанта гену, що кодує S-алозим β -естерази 3 продовжувала знижуватися: навесні – 0,61, восени – 0,48.

Аналіз проведеного порівняння спостережуваних частот генотипів за поліморфними локусами розчинних м'язових β -специфічних естераз (Es2 і Es3) у природному групуванні бичка-кругляка Тилігульського лиману з їх очікуваними частотами, розрахованими згідно з формулою Харді-Вайнберга, показав, що практично в усі сезони протягом 2010-2013 рр., ці частоти достовірно не відрізнялися. Цей факт свідчить про те, що угруповання було рівноважне в досліджуваній період часу. Єдиний виняток зафіксовано навесні 2011 року, коли була виявлена істотна відмінність очікуваних частот генотипів від спостережуваних. Ймовірно угруповання кругляка Тилігульського лиману в той час перебувала під значним впливом екологічних факторів, що призвело до суттєвих змін у частотах генотипів і алелів.

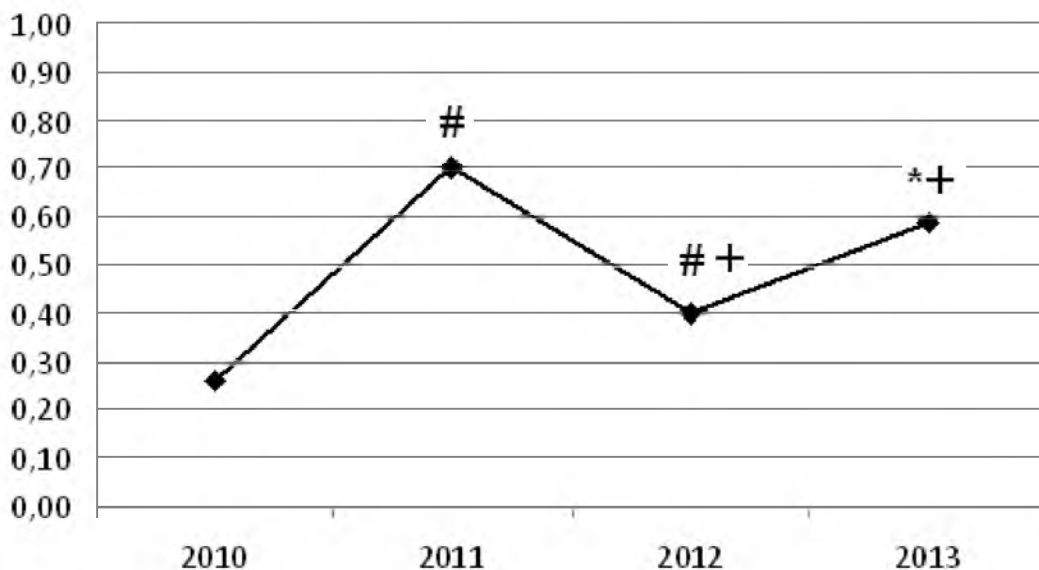


Рис. 2. Динаміка середніх частоти S-алелю за локусом естерази 2 в групуванні бичка-кругляка Тилігульського лиману

Примітка. По вертикалі – частоти алелю, по горизонталі – роки досліджень. # - достовірні відмінності від частоти 2010 р., + - достовірні відмінності від частоти 2011 р., * - достовірні відмінності від частоти 2012 р.; $n = 40$.

Виникає питання, чому в інші сезони, коли так само спостерігали істотні зміни генетичної структури за поліморфними локусами, не відзначено невідповідності між частотами генотипів, що спостерігаються і очікуваними? Це можна пояснити тим, що основні зміни в генетичній структурі угруповання бичка-кругляка відбуваються в літній та зимовий період.

Саме тому, аналізуючи частоти генотипів і алелів навесні та восени, виявляємо результати цих процесів.

Висновки

1. Спектр естераз в м'язових тканинах бичка-кругляка Тилигульського лиману складався з 4 основних зон, кожна з яких кодується окремим локусом. Наявністю поліморфізму характеризувались гени **Es2** і **Es3**.
2. Ген **Es3** у особин бичка-кругляка з осені 2010 р. по весну 2012 р. був мономорфним, з осені 2012 р. у нього з'явилися два алельні варіанти. Це вказує на можливість міграції риб з інших локалітетів.
3. Частоти алелей та генотипів за поліморфними локусами естераз суттєво змінювались у особин бичка-кругляка Тилигульського лиману протягом періоду досліджень, що вказує на існування впливу факторів динаміки генетичної структури на це угруповання риб.

1. **Avise C. J.** Molecular markers, natural history and evolution / C. J. Avise. – Sanderland (Massachusetts): Sinauer Ass. Inc., 2004. – 684 p.
2. **Shaklee J. B.** Gene nomenclature for protein-coding loci in fish / J. B. Shaklee, F. W. Allendorf, D. C. Morizot, G. S. Whitt // Transaction Amer. Fish. Soc. – 1990. – Vol. 119. – P. 2–15.
3. **Атраментова Л.** Статистичні методи в біології / Л. Атраментова, О. Утевська. – Харків: ХНУ, 2007. – 288 с.
4. **Бельницька О. М.** Екологія і суспільство: збірник наукових праць / О. М. Бельницька, Н. П. Лощкарьова. – Одеса: Друкарський дім, 2008. – 189 с
5. **Заморов В. В.** Поліморфізм по локусу β-естераз бычка-кругляка **Neogobius melanostomus** Одеського залива і акваторії острова Змеиний / В. В. Заморов, Д. Б. Радионов // Гидробиол. журн. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 67–77.
6. **Корочкин Л. И.** Генетика изоферментов / Л. И. Корочкин, О. Л. Серов, А. И. Пудовкин. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
7. **Тоцький В. М.** Генетика / В. М. Тоцький. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.

О. В. Куликова, В. В. Заморов, В. А. Кучеров, Д. Б. Радионов

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Украина

ДИНАМИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ГРУППИРОВКИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА NEOGOBIUS MELANOSTOMUS В ТИЛИГУЛЬСКОМ ЛИМАНЕ ПО ЛОКУСАМ ЭСТЕРАЗ

Проведены исследования и анализ динамики генетической структуры группировки бычка-кругляка Тилигульского лимана по локусам водорастворимых мышечных эстераз. Выявлено количество молекулярных форм данного фермента и локусов, которые их кодируют в изученной группе рыб. Определены мономорфные и полиморфные локусы эстераз. Прослежено изменения в частотах аллелей и генотипов по полиморфным локусам в группировках бычка-кругляка в Тилигульском лимане в течение всего периода исследований. Динамика генетической структуры группировки бычка-кругляка позволяет сделать предположение о миграции рыб из других локалитетов.

Ключевые слова: **Neogobius melanostomus**, эстеразы, молекулярные формы ферментов, полиморфизм, частоты аллелей и генотипов

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

I.I. Mechnykov Odesa National University, Ukraine

DYNAMICS OF GENETIC STRUCTURE OF ROUND GOBIES NEOGOBIUS MELANOSTOMUS IN TILIGUL ESTUARY ON ESTERASE LOCUS

The study and analysis of the genetic structure of round gobies in Tiligul Estuary on soluble muscle esterase was revealed. The number of molecular forms of this enzyme and locus that encode them in studied group of fish. Monomorphic and polymorphic esterase loci are identified. The changes in the frequencies of alleles and genotypes of polymorphic loci esterase from autumn 2010 to autumn 2013 were observed. The significant changes in the frequency of alleles and genotypes of polymorphic loci