

Т. А. Нагорнюк, к.с.-г.н., Інститут рибного господарства НААН

Досліджено генетичну структуру різновікових груп білого товстолобика за використання генетико-біохімічних маркерів – *Pralb*, *EST*, *MDH*, *ME*, *CA*. У однорічок білого товстолобика високий фактичний рівень гетерозиготності виявлено за локусом *EST* (76,7 %), у дворічок за локусами *EST* (75 %) і *CA* (66,7 %). Рівень середньої гетерозиготності на локус у групі трирічок становив 77,2 % проти 50,2 % очікуваного. Значення генетичних відстаней у різновікових груп білого товстолобика становили між групами дво- і трирічок ($D_N=0,015$), групами одно- і трирічок ($D_N=0,028$), групами одно- і дворічок ($D_N=0,043$).

Ключові слова: білий товстолобик, генетико-біохімічні маркери, генетична структура, алелі, генотип, гетерозиготність.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. У ставових господарствах України одним з важливих об'єктів товарного рибництва є білий і строкатий товстолобик. При використанні в селекційній роботі обмеженої кількості плідників під час формування племінного матеріалу товстолобиків спостерігається отримання гібридного потомства, підвищення рівня інбридингу та звуження генетичної різноманітності. Тому вкрай важливим і необхідним є збільшення гетерогенності племінних стад та підвищення рівня життєстійкості риб [1].

З метою формування племінних стад рослинорібних риб, які б у подальшому забезпечили широкомасштабне відтворення та потреби виробництва у високоякісному рибопосадковому матеріалі, необхідно розширити обсяги селекційної роботи з наявним в Україні племінним матеріалом, а також періодично проводити завезення в окремі господарства генетично чистого матеріалу білого і строкатого товстолобиків з материнських водойм з наступним його генетичним контролем [2].

В генетичних і селекційних дослідженнях у рибництві перспективним є використання біохімічної мінливості. Аналіз поліморфізму білків надає важливу інформацію про гетерогенність вихідного матеріалу, що є важливим при плануванні селекційно-племінної роботи. Вивчення біохімічних маркерів дозволяє оцінити генетичну структуру популяцій, спостерігати за її змінами при формуванні маточних стад риб, дозволяє визначати їх генетичну різноякісність [3].

Дослідження спрямовані на виконання низки фундаментальних та прикладних завдань з питань збереження, сталого розвитку та вивчення біологічних ресурсів водних екосистем, селекції та генетики в рибництві дадуть змогу розробити нові економічно доцільні підходи ведення аквакультури з урахуванням останніх змін в умовах господарювання [2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Зарубіжними дослідниками проводилось вивчення окремих молекулярно-генетичних маркерів рослинорібних риб [4–13]. Науково обґрунтована

можливість використання фракційного складу гемоглобіну у білого товстолобика в якості біохімічного маркера при проведенні селекційних робіт при зарибленні водойм комплексного використання [4].

На сьогодні в літературі зустрічаються дослідження генетичної структури українських популяцій товстолобиків за використання мікросателітних локусів [14]. Практично відсутні роботи вітчизняних авторів з генетичних досліджень різних видів товстолобиків з використанням біохімічних маркерів.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Формування чистопородних племінних стад білого і строкатого товстолобиків потребує постійного їх генетичного контролю на різних вікових етапах. Тому одним з важливих питань в рибництві є проведення оцінки генетичної структури племінних стад різноманітних об'єктів рибозавезення.

Постановка завдання. Мета дослідження – вивчити генетичні особливості різновікових груп білого товстолобика за використання генетико-біохімічних маркерів.

Вихідний матеріал, методика та умови дослідження. В умовах ДП рибгоспу «Галицький» Івано-Франківської обл. для дослідження генетичної структури білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) проводили відбір зразків крові у різновікових груп: однорічки (n=30), дворічки (n=30), трирічки (n=37).

Зразки крові товстолобиків відбирались прижиттєво з хвостової вени у пластикові пробірки з гепарином. Зразки центрифугували при 3 тис. обертів 10 хв. Фасували фракції крові в окремі пробірки і зберігали при -20 °С.

Проведено аналіз генетичної структури товстолобиків за генетико-біохімічними маркерами – локусами преальбуміну (*Pralb*), естерази (*EST*, *КФ 3.1.1.1*), малатдегідрогенази (*MDH*, *КФ 1.1.1.37*), малік-ензиму (*ME*, *КФ 1.1.1.40*) та карбоангідрази (*CA*, *КФ 4.2.1.1*).

Для досліджень використовували методи вертикального поліакриламідного та горизонтального крохмального електрофорезів [15, 16] з власними модифікаціями з наступним гістохімічним

фарбуванням [17] та генотипуванням згідно рекомендацій авторів [8]. Для вивчення генетичної диференціації розраховували частоти алелів і генотипів, фактичну (H_{obs}) і очікувану (H_{exp}) гетерозиготність [18]. Генетичну диференціацію визначали за допомогою коефіцієнта генетичних дистанцій Нея (D_N) [19]. Статистичне опрацювання отриманих результатів виконували за використання комп'ютерної програми "Biosys-1" [20].

Результати досліджень. Проведений аналіз генетичної структури білого товстолобика за використання генетико-біохімічних маркерів дозволив спостерігати відмінності за частотою алелів у різновікових груп риб (табл. 1).

За локусом *EST* у групі однорічок і дворічок

білого товстолобика значно переважала частота швидкомігруючого алелю *Est F*, порівняно з алелем *Est S*. В групах однорічок товстолобика за локусом *MDH* та дворічок за локусами *CA* і *ME* алель, який швидше рухався до катоду, зустрічався з вищою частотою, ніж повільномігруючий алель. Спостерігались певні особливості розподілу алелів локусу *Pralb* в групі однорічок. Так, частота повільномігруючого алелю *Pralb B* (0,733) значно переважала частоту алелю *Pralb A* (0,267).

У різновікових груп товстолобиків виявлено відмінності за розподілом фактичних і очікуваних гетерозиготних генотипів досліджуваних локусів (табл. 2).

Таблиця 1

Частота алелів за генетико-біохімічними маркерами у товстолобиків

Локус	Апель	Частота алелів у різновікових груп білого товстолобика		
		однорічка (n=30)	дворічка (n=30)	трирічка (n=37)
<i>EST</i>	<i>F</i>	0,617	0,625	0,515
	<i>S</i>	0,383	0,375	0,485
<i>MDH</i>	<i>F</i>	0,617	0,550	0,581
	<i>S</i>	0,383	0,450	0,419
<i>ME</i>	<i>F</i>	0,500	0,650	0,527
	<i>S</i>	0,500	0,350	0,473
<i>Pralb</i>	<i>A</i>	0,267	0,550	0,514
	<i>B</i>	0,733	0,450	0,486
<i>CA</i>	<i>F</i>	0,600	0,667	0,571
	<i>S</i>	0,400	0,333	0,429

Проведений аналіз генетичної мінливості за показником F-статистики Райта (F_{IS}) показав, що у групі трирічок, на відміну від інших груп, найнижчі значення F_{IS} виявлені за всіма локусами: *EST* (-0,699), *MDH* (-0,499), *ME* (-0,355), *Pralb* (-0,731) і *CA* (-0,517), що свідчить про нерівновагу

генетичної структури. У вибірці дворічок товстолобика надлишок гетерозигот присутній за локусами *EST* і *CA* ($F_{IS} = -0,600$ і $-0,500$, відповідно). У однорічок невідновлений стан генетичної структури спостерігався за локусом *EST* ($F_{IS} = -0,622$).

Таблиця 2

Розподіл особин товстолобиків з гетерозиготними генотипами

Локус	Різнорічкові групи білого товстолобика								
	однорічка			дворічка			трирічка		
	G_{obs}	G_{exp}	F_{IS}	G_{obs}	G_{exp}	F_{IS}	G_{obs}	G_{exp}	F_{IS}
<i>EST</i>	23	14,4	-0,622	21	13,4	-0,600	28	16,7	-0,699
<i>MDH</i>	19	14,4	-0,340	19	15,1	-0,279	27	18,3	-0,499
<i>ME</i>	15	14,7	-0,034	17	13,9	-0,245	25	18,7	-0,355
<i>Pralb</i>	12	11,9	-0,023	17	15,1	-0,145	32	18,7	-0,731
<i>CA</i>	18	14,6	-0,250	20	13,6	-0,500	26	17,4	-0,517

Примітка: G_{obs} – фактична кількість гетерозигот; G_{exp} – очікувана кількість гетерозигот; F_{IS} – індекс фіксації Райта.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що селекційна робота з товстолобиками на різних вікових етапах відбувалась у напрямку відбору, збереження та виживання гетерозиготних особин.

Проведений розрахунок рівня гетерозиготності за досліджуваними локусами показав, що в

групах білого товстолобика високий фактичний рівень гетерозиготності виявлено за локусом *EST* (76,7 %) у однорічок, локусами *EST* (75 %) і *CA* (66,7 %) у дворічок та всіма локусами, включеними у дослідження, у трирічок (табл. 3).

Таблиця 3

Рівень середньої гетерозиготності за генетико-біохімічними маркерами

Вікова група	<i>H</i>	<i>EST</i>	<i>MDH</i>	<i>ME</i>	<i>Pralb</i>	<i>CA</i>	$H_{середня}$
однорічки	H_{obs}	0,767	0,633	0,517	0,400	0,600	0,583±0,061
	H_{exp}	0,481	0,481	0,509	0,398	0,488	0,471±0,019
дворічки	H_{obs}	0,750	0,633	0,567	0,567	0,667	0,637±0,034
	H_{exp}	0,477	0,503	0,463	0,503	0,452	0,480±0,010
трирічки	H_{obs}	0,848	0,730	0,676	0,865	0,743	0,772±0,036
	H_{exp}	0,507	0,494	0,505	0,506	0,497	0,502±0,003

Примітка: H_{obs} – фактичний рівень гетерозиготності; H_{exp} – очікуваний рівень гетерозиготності.

На врівноважений стан генетичної структури груп риб вказує розрахований рівень середньої гетерозиготності на локус в групах однорічок (58,3 і 47,1 %, фактичний і очікуваний відповідно) і дворічок (63,7 і 48 %, фактичний і очікуваний відповідно).

Високий рівень середньої гетерозиготності на локус спостерігався у трирічок білого товстолобика (фактичний 77,2 % проти 50,2 % очікуваного), що свідчить про стан генетичної нерівноваги цієї популяції та потребує проходження процесу досягнення певної генотипової стабільності.

Розраховані значення генетичних відстаней за Неєм (1978) на основі аналізу розподілу алелів та генотипів за п'ятьма біохімічними маркерами у різновікових груп білого товстолобика були незначними та становили між групами дво- і трирічок ($D_N=0,015$), групами одно- і трирічок ($D_N=0,028$), групами одно- і дворічок ($D_N=0,043$). Кластерний аналіз показав, що найбільший вклад у формування генетичної структури популяцій білого товстолобика вносить група трирічного віку.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Виконаний аналіз генетичної структури різновікових груп білого товстолобика за поліморфними генетико-біохімічними маркерами: *Pralb*, *EST*, *MDH*, *ME* та *CA*. За частотою алель-

них варіантів спостерігали особливості їх розподілу у груп однорічок і дворічок білого товстолобика за всіма локусами. У групі трирічок товстолобиків частота повільно- і швидкомігруючих алельних варіантів досліджуваних локусів перебувала в близьких межах і помітно не відрізнялась.

Найвищий фактичний рівень середньої гетерозиготності на локус спостерігався у групі трирічок і становив 77,2 %, що вказує на необхідність підтримання в цій популяції стану генетичної рівноваги та консолідованості.

Розраховані генетичні відстані між різновіковими групами білого товстолобика були незначними і знаходились у межах від $D_N=0,015$ до $D_N=0,043$. Генетичні взаємовідношення між групами риб, дозволяють стверджувати, що генетична структура групи трирічного віку робить найбільший вклад у формування генетичної структури популяції білого товстолобика.

У подальшій роботі при вивченні генетичних особливостей українських популяцій товстолобиків планується розширити спектр молекулярно-генетичних маркерів. Подальше дослідження і аналіз рівня гетерозиготності популяцій товстолобиків дозволить простежити за динамікою показників їх генетичного різноманіття.

Список використаної літератури:

1. Організація селекційно-плеєнної роботи в рибництві / [Гринжевський М. В., Шерман І. М., Грициняк І. І. та ін.]; за ред. М. В. Гринжевського, І. М. Шермана. – К.: «Рибка моя», 2006. – 352 с.
2. Грициняк І. І. Пріоритетні напрями наукового забезпечення рибного господарства України / І. І. Грициняк, О. М. Третяк // Рибогосподарська наука України. – 2007. – № 1. – С. 5–20.
3. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб / Кирпичников В. С. : Л. : Наука, 1987. – 520 с.
4. Карнаухов Г. И. Возрастная динамика фракционного состава гемоглобина и сывороточных белков у рыб дальневосточного комплекса : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.00.10 «Ихтиология» / Г. И. Карнаухов. – М., 1988. – 24 с.
5. Zhao J. L. Isoenzyme analysis of population divergence of silver carp, bighead carp, grass carp and black carp in the middle and lower stream of Changjiang River / J. L. Zhao, S. F. Li // Journal of Fisheries of China. – 1996. – V. 20 (2). – P. 104–110.
6. Wu Lizhao. Biochemical genetic structure and variation in a natural population of silver carp from the middle reaches of the Yangtze River / Wu Lizhao, Wang Zuxiong // Acta Hydrobiologica Sinica. – 1997. – V. 21, N 2. – P. 157–162.
7. Wu Lizhao. Studies on the expressions and regulations of isozymic genes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during ontogenesis / Wu Lizhao, Wang Zuxiong // Acta Hydrobiologica Sinica. – 1997. – V. 21, N 1. – P. 49–58.
8. Карнаухов Г.И. Альбумины белого и пестрого толстолобиков / Г.И. Карнаухов, В.Д. Василиади // Проблемы воспроизводства растительноядных рыб, их роль в аквакультуре : материалы международной научно-практической конференции. – Краснодар: «Здравствуйте», 2000. – С. 23–24.
9. Карнаухов Г.И., Василиади В.Д. Трансферрины белого и пестрого толстолобиков / Г.И. Карнаухов, В.Д. Василиади // Проблемы воспроизводства растительноядных рыб, их роль в аквакультуре : материалы международной научно-практической конференции. – Краснодар: «Здравствуйте», 2000. – С. 22–23.
10. Семенов А. П. Биохимико-генетические исследования генеалогической разнокачественности ремонтно-маточного стада белого амура и белого толстолобика / А. П. Семенов, Е. В. Таразевич, В. Б. Сазанов // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси. – 2006. – Вып. 22. – С. 36–44.
11. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) / M. J. Liao, G. P. Yang, X. C. Wang [et al.] // Molecular Ecology Notes. – 2007. – V. 7 (1). – P. 95–99.
12. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudo-testcross strategy / M. Liao, L. Zhang, G. Yang [et al.] // Animal genetics. – 2007. – V. 38 (4). – P. 364–370.
13. Демкина Н. В. Результаты использования биохимических маркеров в селекции карповых рыб – опыт ВНИИПРХ / Н.В. Демкина, Е.В. Новикова, В.А. Демкин // Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и

- воспроизводство рыб : междунар. конф., 10-12 сент. 2008 г. : тезисы докл. – Санкт-Петербург, 2008. – С. 58–59.
14. Сравнительный анализ двух популяций белого толстолоба (*Hypophthalmichthys molitrix*) и карпа (*Cyprinus carpio*) с использованием микросателлитных ДНК-маркеров / И. С. Резникова, В. В. Степура, А. В. Шелев [и др.] // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – Т. 9. – С. 64–69.
15. Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins / B. J. Davis // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404–408.
16. Глазко В. И. Генетика изоферментов животных и растений / В. И. Глазко, И. А. Созинов. – К. : Урожай, 1993. – 528 с.
17. Генетика изоферментов / [Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовник А. И. и др.]. – М. : Наука, 1977. – 275 с.
18. Животовский Л. А. Популяционная биометрия / Животовский Л. А. – М. : Наука, 1991. – 271 с.
19. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals / M. Nei // Genetics. – 1978. – V. 89. – P. 583–590.
20. Swofford D. L. Biosys-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics / D. L. Swofford, R. B. Selander // J. Heredity. – 1981. – V. 72. – P. 281–283.

Нагорнюк Т. А. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ГРУПП БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБИКА

Исследовано генетическую структуру групп белого толстолобика с использованием генетико-биохимических маркеров – Rralb, EST, MDH, ME, CA. У годовиков белого толстолобика высокий фактический уровень гетерозиготности выявлен по локусу EST (76,7 %), у двухгодовиков по локусам EST (75 %) и CA (66,7 %). Уровень средней гетерозиготности на локус в группе трехгодовиков составлял 77,2 % в отличие от 50,2 % ожидаемого. Значения генетических расстояний у разновозрастных групп белого толстолобика находились на уровне $D_N=0,015$ между группами двух- и трехгодовиков, группами годовиков и трехгодовиков ($D_N=0,028$), группами годовиков и двухгодовиков ($D_N=0,043$).

Ключевые слова: белый толстолобик, генетико-биохимические маркеры, генетическая структура, аллели, генотип, гетерозиготность.

Nagornyuk T. PECULIARITIES OF GENETIC STRUCTURE OF DIFFERENT AGE GROUPS OF SILVER CARP

Genetic structure of different age groups of silver carp of fish farm "Galitski" Ivano-Frankivsk region by using polymorphic genetic-biochemical markers – Rralb, EST, MDH, ME, CA has been investigated. There were calculated the frequency of allelic and genotypic variants, find out observed and expected levels of heterozygosity per each locus and level of average heterozygosity by all loci, calculated genetic distances and performed cluster analysis of genetic relationships between the different age groups of silver carp. By the frequency of allelic variants were observed peculiarities of their allocation in groups of yearlings and two-years age of silver carp by loci of Rralb, EST, MDH, ME, CA. The frequency of slowly and fast migrating allelic variants of studied loci in groups of three-years age of silver carp didn't differ significantly. We observed credible excess of heterozygous individuals by studied loci which indicates that three-years age carp have unbalanced state of genetic structure. Highest level of average heterozygosity at locus was 77.2 % instead of expected, which was 50.2 %. Therefore it is necessary to control the state of genetic balance in this population. According to Nei's statistics were counted genetic distances between different age groups of silver carp by the frequency of alleles and genotypes of five biochemical markers. Genetic distance between groups of two- and three-years age carp was ($D_N = 0.015$), groups of yearlings and three-years age carp was ($D_N = 0,028$) and groups of yearlings and two-years age was ($D_N = 0,043$).

The results of our investigations allow us to state that genetic structure of the three-year age groups have a greatest contribution in the process of creation of population genetic structure of silver carp.

Key words: silver carp, genetic-biochemical markers, genetic structure, alleles, genotype, heterozygosity.

Дата надходження до редакції: 01.07.2014 р.

Рецензент: доктор с.-г. наук, професор Л.М.Хмельничий