

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ УКРАИНСКИХ ЧЕШУЙЧАТЫХ И РАМЧАТЫХ КАРПОВ АНТОНИНСКО-ЗОЗУЛЕНЕЦКОГО ТИПА

Игорь Грициняк, Татьяна Нагорнюк, Алла Мариуца, Сергей Тарасюк

Институт рыбного хозяйства НААН, ул. Обуховская, 135, 03164, Киев, Украина  
tarasjuk@ukr.net, achtaan@ukr.net

*Исследовано генетическую структуру разновозрастных групп чешиуичатых и рамчатых карпов антонинско-зозуленецкого типа по генетико-биохимическим маркерам. Показаны особенности распределения частот аллелей по полиморфным локусам TF, ALB, EST, CA, MDH, ME, SOD, KAT. Установлен уровень фактической и ожидаемой гетерозиготности по каждому локусу, средней гетерозиготности на локус и уровень генетической изменчивости. Генетическая дендрограмма показала отдаленность чешиуичатых карпов трехгодовиков от исследуемых групп.*

Повышение уровня продуктивности прудовых рыб зависит от уровня селекционно-племенной работы, которая обеспечивает улучшение биологических и продуктивных качеств рыб путем усовершенствования существующих и выведения новых пород и внутривидовых типов (Гринжевский и Пекарский, 2004; Гринжевский и др., 2006).

В настоящее время особую актуальность приобретают задания поиска новых подходов усовершенствования существующих пород в условиях современного рыбоводства, которые должны охватывать и высокий потенциал продуктивности и приспособленности к промышленным технологиям. Это объясняется увеличением роли селекции, направленно изменяющей качество животных. Применение селекционных программ скрещивания и гибридизации является одним из методов повышения генетического потенциала продуктивности рыб. Этим предопределена актуальность всестороннего изучения генетических особенностей, в первую очередь существующих в Украине внутривидовых типов карпов, в частности, с использованием последних достижений и методов молекулярной генетики.

Использование маркерных генов для контроля генетической структуры рыб вошло в практику рыбоводства многих стран (Калашникова и др., 2000; Perez-Ruzafa и др., 2006; Roark и др., 2005).

Сегодня наиболее актуальным заданием является использование современных методов исследований в рыбоводстве, которое включает практические аспекты генетического мониторинга. Одной из задач генетического мониторинга является постоянный контроль за изменением генетической структуры, а также поддержка в стадах генетического разнообразия, которое является необходимым условием для сохранения биоразнообразия и проведения селекционной работы. Решение этих заданий нуждается как в обобщении предыдущих исследований, так и проведения исследований с использованием молекулярно-генетических маркеров рыб.

Использование изоферментов как генетических маркеров является важным механизмом контроля за генетическими процессами при создании новых пород животных (Зубец и др., 1997). Он включает ряд этапов: генетическую изменчивость родительских форм, изменения генных частот в последующих поколениях и степень их консолидации. Использование изоферментов позволяет ускорить процесс перенесения генетического материала, связанного с продуктивными качествами животных. Эффективность использования изоферментов повышается с увеличением количества биохимических маркеров.

Благодаря своим качествам, исходя из истории создания, в структуре украинских пород особое место занимает антонинско-зозуленецкий тип карпа, который стал основой для других внутривидовых типов. Основой антонинско-зозуленецких карпов являются племенные стада, созданные под руководством А.И. Куземы на протяжении 1922–1953 годов. Они представлены двумя формами: чешуйчатой и рамчатой. В своей наследственной основе карпы антонинско-зозуленецкого внутривидового типа имеют 50% наследственности аборигенных чешуйчатых и 50% зеркальных галицких карпов (Грициняк и др., 2008).

С 2003 года совместно с сотрудниками Института рыбного хозяйства продолжается работа по возрождению исторического генофонда антонинско-зозуленецкого карпа (Коцюба и Горбач, 2010; Алексеенко и др., 2012).

С целью изучения особенностей и динамики генетической структуры групп чешуйчатых и рамчатых карпов антонинско-зозуленецкого типа проведен анализ распределения аллелей и генотипов с использованием генетико-биохимических систем.

## Материалы и методы

В исследования включены 6 разновозрастных групп украинских чешуйчатой и рамчатой пород карпа антонинско-зозуленецкого типа: годовики, двухгодовики и трехгодовики, отловленные на протяжении 2009–2011 годов из прудов ГП СГЦР «Подилля» Хмельницкой области (Украина).

При исследовании генетической структуры в качестве молекулярно-генетических маркеров использовали оценку полиморфизма генетико-биохимических систем: трансферрина (*TF*), альбумина (*ALB*), эстеразы (*EST*,

КФ 3.1.1.1), карбоангидразы (СА, КФ 4.2.1.1), NAD-зависимой малатдегидрогеназы (MDH, КФ 1.1.1.37), NADP-зависимой малатдегидрогеназы (малик-энзим, ME, КФ 1.1.1.40), супероксиддисмутазы (SOD, КФ 1.15.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6).

Взятие образцов крови производили прижизненно у рыб из хвостовой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в расчете 25 МЕ на 1 мл крови. Кровь центрифугировали при 3 тыс. об./мин на протяжении 10 мин и отделяли плазму от эритроцитов. Образцы крови хранили в морозильных камерах при  $t = -18^{\circ}\text{C}$ .

Проводили электрофоретический анализ белков плазмы крови в 9% полиакриламидном геле (Davis, 1964), что позволило типировать на одной пластине геля аллели локусов трансферрина, альбумина и эстеразы. Электрофоретический анализ ферментов эритроцитов проводили с использованием горизонтального электрофореза в 13% крахмальном геле (Harris и Hopkinson, 1976) с собственными модификациями, последующим гистохимическим окрашиванием и генотипированием (Корочкин и др., 1977).

Математическую обработку данных (расчет генетических дистанций, оценка генетического равновесия в соответствии с Харди-Вайнбергом, построение дендрограммы генетических взаимоотношений) проводили с использованием компьютерной программы "BIOSYS-1" (Swofford и Selander, 1981).

## Результаты

Исследовано особенности генетической структуры разновозрастных групп украинских чешуйчатой и рамчатой пород карпа антонинско-зозуленецкого типа с использованием 8-ми генетико-биохимических маркеров. В результате проведенного анализа выявлены особенности распределения частот аллелей генетико-биохимических систем (табл. 1).

Аллельный вариант А локуса трансферрина встречался у чешуйчатых карпов с частотой от 0,088 у годовиков, 0,016 у двухгодовиков до 0,100 у трехгодовиков. У рамчатых карпов аллель *TfA* присутствует с частотой 0,114 и 0,100 у годовиков и трехгодовиков соответственно, у двухгодовиков этот аллельный вариант не встречался. Частота аллеля *TfB* у чешуйчатых карпов – от 0,044 до 0,109, а в группах рамчатых карпов частота *TfB* находилась в пределах от 0,029 до 0,183.

У исследованных групп карпов из пяти выявленных аллельных вариантов локуса TF наблюдается высокая концентрация аллеля *TfC<sub>1</sub>*, частота которого у разных возрастных групп значительно не отличается (табл. 1), что свидетельствует о доминировании особей с аллелем *TfC<sub>1</sub>*, что также отмечалось и у ропшинских карпов (Щербенок, 1980).

Следует отметить, что у чешуйчатых карпов селекция ведется на повышение частоты аллеля *TfC<sub>2</sub>* от 0,147 до 0,350, хотя у рамчатых особей наблюдается снижение частоты этого аллельного варианта от 0,171 у годовиков до 0,050 у трехлеток.

Таблица 1. Особенности распределения аллельных вариантов по локусам генетико-биохимических систем у карпов антонинско-зозуленецкого типа  
 Table 1. Specificity of allocation of allelic variants by loci of the genetic-biochemical systems in carps of the Antoninsky-Zozulenets type

Локусы Loci	Чешуйчатые карпы Scaled carps			Рамчатые карпы Framed carps		
	годовики age 1	двухгодовики age 2	трехгодовики age 3	годовики age 1	двухгодовики age 2	трехгодовики age 3
<i>TF</i> (n)	34	32	30	35	30	30
A	0,088	0,016	0,100	0,114	0,000	0,100
B	0,044	0,109	0,050	0,029	0,183	0,150
C <sub>1</sub>	0,574	0,563	0,500	0,671	0,700	0,600
C <sub>2</sub>	0,147	0,297	0,350	0,171	0,083	0,050
D	0,147	0,016	0,000	0,014	0,033	0,100
<i>ALB</i> (n)	35	32	30	35	30	30
A	0,400	0,422	0,600	0,429	0,550	0,550
B	0,600	0,578	0,400	0,571	0,450	0,450
<i>EST</i> (n)	34	32	30	35	30	30
F	0,441	0,672	0,500	0,457	0,500	0,700
S	0,559	0,328	0,500	0,543	0,500	0,300
<i>MDH</i> (n)	30	32	30	35	30	30
F	0,617	0,641	0,600	0,671	0,567	0,650
S	0,383	0,359	0,400	0,329	0,433	0,350
<i>ME</i> (n)	34	32	30	35	30	30
F	0,471	0,562	0,550	0,443	0,550	0,600
S	0,529	0,438	0,450	0,557	0,450	0,400
<i>CA</i> (n)	34	32	30	35	30	30
F	0,544	0,687	0,450	0,557	0,633	0,600
S	0,456	0,313	0,550	0,443	0,367	0,400
<i>SOD</i> (n)	35	31	30	35	29	30
F	0,571	0,468	0,650	0,586	0,466	0,550
S	0,429	0,532	0,350	0,414	0,534	0,450
<i>KAT</i> (n)	35	31	30	35	29	30
F	0,500	0,613	0,350	0,443	0,569	0,700
S	0,500	0,387	0,650	0,557	0,431	0,300

Распределение аллельного варианта D по локусу *TF* у разных возрастных групп карпа имеет некоторые отличия. У чешуйчатых карпов частота аллеля *Tf* D снижается от 0,147 у годовиков до нуля у трехгодовиков, а у рамчатых – увеличивается от 0,014 до 0,100 (табл. 1).

В зоне альбумина отличия выявлены у чешуйчатых карпов: у годовиков преобладает аллель с высокой молекулярной массой *Alb* B (0,600), у трехгодовиков чаще встречается аллельный вариант с низкой молекулярной массой *Alb* A (0,600). В группах рамчатого карпа частота обоих аллельных вариантов по локусу *ALB* значительно не отличается (табл. 1).

Распределение аллелей с высокой и низкой молекулярной массой локуса эстеразы показало наличие отличий у двухгодовиков чешуйчатого

и трехгодовиков рамчатого карпов, у которых значительно преобладает частота аллельного варианта *Est F*, сравнительно с аллелем *Est S*. В других исследуемых группах карпов частота аллелей локуса *EST* значительно не отличается.

Локус малатдегидрогеназы во всех возрастных группах карпов отличался более высокой частотой аллеля *Mdh F*, ежели аллеля *Mdh S*. У чешуйчатых карпов частота *Mdh F* находилась в пределах от 0,600 до 0,641, а у рамчатых карпов – от 0,567 до 0,671.

По частоте аллельных вариантов *Me F* и *Me S* во всех исследуемых группах отличий не выявлено.

По локусу *CA* отличия между группами карпов выявлены у двухгодовиков, у которых частота аллеля с низкой молекулярной массой *Ca F* значительно выше, чем *Ca S*, и становит 0,687 у чешуйчатых карпов и 0,633 у рамчатых (табл. 1).

Группа трехгодовиков чешуйчатого карпа отличалась распределением аллельных вариантов локуса *SOD*: значительным преобладанием частоты аллеля с низкой молекулярной массой *Sod F* (0,650), в отличие от частоты аллеля с высокой молекулярной массой *Sod S* (0,350).

Выявлены породоспецифические и возрастные особенности локуса каталазы. У чешуйчатых карпов трехгодовиков частота аллеля с высокой молекулярной массой *Kat S* была выше (0,650), в отличие от рамчатых трехгодовиков, у которых чаще встречался аллель с низкой молекулярной массой *Kat F* (0,700). У двухгодовиков чешуйчатого карпа частота аллеля *Kat F* была выше, чем *Kat S*, и становила 0,613.

У чешуйчатых карпов годовиков по исследованным генетико-биохимическим системам фактический уровень гетерозиготности достоверно преобладал над ожидаемым из-за избытка гетерозигот по локусам *MDH*, *ALB*, *CA*, *SOD* и *KAT* (табл. 2). У чешуйчатых карпов двухгодовиков статистически достоверные отличия между *Ho* и *He* также выявлены по локусам *MDH*, *ME*, *ALB*, *CA*, *SOD* и *KAT*, что свидетельствует о неуравновешенном состоянии генетической структуры этих групп рыб по исследованным локусам (табл. 2).

У трехгодовиков чешуйчатого карпа только по локусу *ME* выявлен избыток гетерозиготных особей с генотипом *FS* (90 %,  $P < 0,05$ ).

Следует отметить, что во всех группах чешуйчатых карпов только по локусам *TF* и *EST*, а также у карпов трехгодовиков и по другим исследованным локусам, кроме *ME*, достоверных отличий по уровню фактической и ожидаемой гетерозиготности не выявлено.

У годовиков рамчатых карпов избыток гетерозиготных особей, который привел к повышению уровня фактической гетерозиготности, выявлен по локусам *EST*, *MDH*, *ALB*, *CA*, *SOD* и *KAT* (табл. 2). У карпов двухгодовиков высокий уровень фактической гетерозиготности наблюдался по локусам *EST*, *ME*, *ALB*, *CA*, *SOD* и *KAT* (табл. 2).

По значениям генетических расстояний между исследованными группами, рассчитанных на основании генетических дистанций (Nei, 1978), выявлены межгрупповые отличия у исследованных групп карпов. На основании индекса идентичности построены дендрограммы, которые позволили оценить генетическое родство разновозрастных групп исследованных пород карпа (рис. 1).

Таблица 2. Уровень средней гетерозиготности по исследованным генетико-биохимическим системам у антонинско-зоуленецких карпов  
 Table 2. The levels of average heterozygosity according to investigated genetic-biochemical markers of carps of the Antoninsky-Zoulenetsky type

Группы карпа Carp groups	Гетерозиготность Heterozygosity	TF	EST	MDH	ME	ALB	CA	SOD	KAT	Н средняя Average heterozygosity
<b>Щуئيчатые карпы – Scaled carps</b>										
Годовики Age 1	N <sub>o</sub>	0,647	0,471	0,700	0,588	0,800	0,794	0,800	0,829	0,704±0,045
	N <sub>e</sub>	0,627	0,500	0,481	0,506	0,487	0,504	0,497	0,507	0,514±0,017
Двухгодовики Age 2	N <sub>o</sub>	0,594	0,531	0,719	0,750	0,719	0,625	0,871	0,774	0,698±0,039
	N <sub>e</sub>	0,592	0,448	0,468	0,500	0,496	0,437	0,506	0,482	0,491±0,017
Трехгодовики Age 3	N <sub>o</sub>	0,500	0,800	0,800	0,900	0,800	0,700	0,700	0,700	0,737±0,042
	N <sub>e</sub>	0,647	0,526	0,505	0,521	0,505	0,521	0,479	0,479	0,523±0,019
<b>Рамчатые карпы – Framed carps</b>										
Годовики Age 1	N <sub>o</sub>	0,371	0,686	0,600	0,600	0,857	0,771	0,829	0,829	0,693±0,058
	N <sub>e</sub>	0,513	0,504	0,418	0,501	0,497	0,501	0,492	0,501	0,494±0,007
Двухгодовики Age 2	N <sub>o</sub>	0,433	0,800	0,667	0,767	0,767	0,667	0,862	0,724	0,711±0,046
	N <sub>e</sub>	0,476	0,508	0,499	0,503	0,503	0,472	0,506	0,499	0,496±0,005
Трехгодовики Age 3	N <sub>o</sub>	0,600	0,400	0,700	0,400	0,700	0,600	0,700	0,600	0,587±0,044
	N <sub>e</sub>	0,626	0,442	0,479	0,505	0,521	0,505	0,521	0,442	0,505±0,021

N<sub>o</sub> – фактический уровень гетерозиготности, N<sub>e</sub> – ожидаемый уровень гетерозиготности.

N<sub>o</sub> – observed level of heterozygosity, N<sub>e</sub> – expected level of heterozygosity.

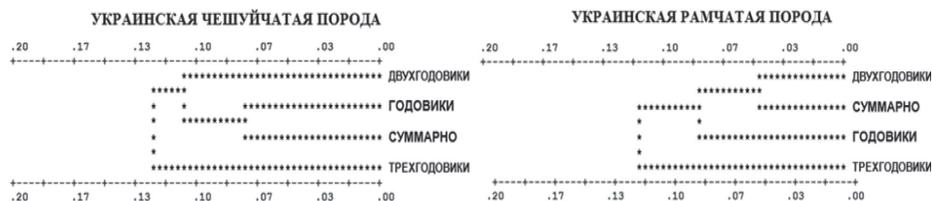


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений разновозрастных групп украинских чешуйчатой и рамчатой пород карпа

Fig. 1. The dendrogram of genetic interactions of different age groups of the Ukrainian scaled and framed breeds of carps

Группы чешуйчатых карпов распределились по исследованным генетико-биохимическим системам на кластеры. На формирование генетической структуры исследуемой популяции чешуйчатых карпов значительное влияние имеет генетическая структура карпов годовиков. Наиболее отдаленной по генетической структуре оказалась группа чешуйчатых карпов трехгодовиков, которая образует независимый кластер. У рамчатых карпов наблюдается специфика распределения между исследованными группами (рис. 1).

### Обсуждение результатов

Уровень гетерозиготности является одной из важных генетических характеристик популяции, по которой определяют уровень генетической консолидированности и генетической вариабельности. Повышение показателя гетерозиготности можно ожидать в случае повышенной приспособленности рыб к конкретной среде. Снижение гетерозиготности, как и ее избыточное повышение, неблагоприятны для нормального функционирования популяции (Алтухов, 1989).

Гетерозиготность влияет на приспособленность (выживание, плодовитость, качество потомства) и, таким образом, определяет много аспектов их взаимоотношений со средой (Алтухов, 1989). Известно, что снижение генетической изменчивости рыб при инбридинге, может сопровождаться ухудшением таких важных биологических показателей, как выживание эмбрионов и личинок, скорость роста, эффективность усвоения корма, форма тела и др (Гринжевский и др., 2006).

По фактическому и ожидаемому уровню гетерозиготности исследованных локусов генетическая структура группы трехгодовиков рамчатых карпов имела уравновешенное состояние, количество гетерозиготных особей соответствовало ожидаемым показателям.

Таким образом, изучение частоты аллельных вариантов и определение значения гетерозиготности по исследованным локусам позволило оценить данные популяции по уровню генетической изменчивости. Анализ

генетического разнообразия по полиморфным системам белков показывает, что целенаправленный отбор рыб на увеличение продуктивных качеств ведет к повышению уровня гомозиготности в отдельных группах карпа.

Генетическая структура трехгодовиков чешуйчатой и рамчатой пород карпа характеризуется некоторыми генетическими особенностями. Возможной причиной такой дифференциации является значительное влияние факторов искусственного отбора.

Таким образом, на основании совокупности полученных данных – величин генетических расстояний и результатов кластерного анализа, рассмотренное распределение аллельных частот у исследованных украинских чешуйчатой и рамчатой пород карпа антонинско-зозуленецкого типа показывает генетическую неоднородность по ряду исследованных белков и ферментов. Генетическая структура трехгодовиков чешуйчатых и рамчатых карпов имеет свою специфику и отличается от других возрастных групп. Изменчивость генетической структуры во времени по конкретному участку генома и определение значения гетерозиготности позволило охарактеризовать данную локальную популяцию по уровню генетической изменчивости.

Изучены особенности генетической структуры разновозрастных групп чешуйчатых и рамчатых карпов антонинско-зозуленецкого типа. Выявлен полиморфизм генетико-биохимических систем крови и определена возможность их использования для оценки генетических сдвигов в породе. Выявлена меж- и внутривидовая изменчивость распределения аллельных вариантов белков и ферментов у разновозрастных групп.

Исследования гетерозиготности в группах карпов позволило проследить за динамикой показателей их генетического разнообразия, наблюдаемого на протяжении нескольких лет.

Результаты проведенных исследований имеют принципиальное значение для дальнейшего усовершенствования теоретических и практических методов создания новых генетических типов украинских пород карпов, наиболее соответствующих агроклиматическим условиям зон их разведения.

### Литература

- Алтухов Ю.П. (2003). Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ "Академкнига", 431.
- Гринжевський М.В., Пекарський А.В. (2004). Оптимізація виробництва продукції аквакультури. К.: Поліграф Консалтинг, 328.
- Гринжевський М.В., Шерман І.М., Грициняк І.І. (2006). Організація селекційно-плеїмної роботи в рибистві., под ред. Гринжевського М.В., Шермана І.М. К.: «Рибка моя», 352.
- Грициняк І.І., Гринжевський М.В., Третяк О.М. (2008). Фермерське рибицтво. К.: Герб, 560.
- Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., V., 121: 404–408.
- Зубец М.В., Буркат В.П., Мельник Ю.Ф. (1997). Генетика, селекція і біотехнологія в скотіводстві. Київ: БМТ, под ред. Зубца М.В., Бурката В.П., 599–702.
- Калашникова Л.А., Дунин І.М., Глазко В.І. (2000). Селекція ХХІ століття: використання ДНК-технологій. – Изд. ВНИИплем, 31.

- Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. (1977). Генетика изоферментов. М.: Наука, 275.
- Коцюба В.М., Горбач М.М. (2010). Стан і перспективи розвитку рибогосподарської діяльності ВАТ «Хмельницькрибгосп». Оптимальне використання, збереження і відтворення водних живих ресурсів – нагальні завдання товаровиробників рибопродукції та наукових установ рибної галузі: матеріали науково-практичного семінару, 12 червня 2009, «FishExpo-2009», К.: НТУУ «КПІ», pp. 61–65.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Олексієнко О.О., Бех В.В., Грициняк І.І. (2012). Використання безперервно поліпшувального відбору в селекції українських коропів. *Рибогосподарська наука України*, 1: 78–87.
- Perez-Ruzafa A., Gonzalez-Wanguemert M., Lenfant P. (2006). Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biol. Conserv.*, 129: 244–255.
- Roark S.A., Nacci D., Coiro L. (2005). Population genetic structure of a nonmigratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 3: 717–725.
- Swofford D.L., Selander R.B. (1981). BIOSYS-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Heredity*, 72: 281–283.
- Harris H., Hopkinson D.A. (1976). *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publ. Comp. Amsterdam, pp. 680.

Zatwierdzono do druku 20 I 2014

IGOR GRYTSINIYAK, TATYANA NAGORNYUK, ALLA MARIUTSA, SERGEY TARASJUK

### **Analysis of genetic structure of Ukrainian scaled and framed carps of the Antoninsky-Zozulenets type**

#### **SUMMARY**

The genetic structure of different age groups of scaled and framed carps of the Antoninsky-Zozulenets type was studied using genetic-biochemical markers. The peculiarities of allele frequency distribution at the polymorphic loci *TF*, *ALB*, *EST*, *CA*, *MDH*, *ME*, *SOD* and *KAT* have been shown. The levels of observed and expected heterozygosity for each locus, average heterozygosity for loci and genetic variability level were established. The genetic dendrogram showed the distance between the three-year scaled carps and the other investigated groups.

Key words: alleles, genotype, locus, heterozygosity, Antoninsky-Zozulenets carp