



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 639.3:575
© 2012

С.І. Тарасюк,
член-кореспондент НААН

А.Е. Маріуца,
кандидат сільсько-
господарських наук

Т.А. Нагорнюк

*Інститут рибного
господарства НААН*

ДИНАМІКА ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ЛУСКАТИХ І РАМЧАСТИХ КОРОПІВ АНТОНІНСЬКО- ЗОЗУЛЕНЕЦЬКОГО ТИПУ

Досліджено генетичну структуру різновікових груп лускатих і рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького типу за 10-ма генетико-біохімічними маркерами. Виявлено особливості розподілу частот алелів у досліджених груп коропів. Установлено рівень фактичної та очікуваної гетерозиготності за кожним локусом, середньої гетерозиготності за всіма локусами та рівнем генетичної мінливості.

Підвищення рівня продуктивності ставкових риб, зокрема коропа, значною мірою залежить від рівня селекційно-плеємної роботи, яка забезпечує поліпшення біологічних і продуктивних якостей риб завдяки вдосконаленню наявних та виведенню нових порід і внутрішньопородних типів [3, 7].

Особливої актуальності набувають завдання пошуку нових підходів до вдосконалення наявних порід тварин в умовах сучасного ведення рибництва. Ці підходи передбачають високий потенціал продуктивності та пристосованість до промислових технологій, що пояснюється збільшенням ролі селекції, яка цілеспрямовано змінює ознаки і властивості тварин. Застосування селекційних програм схрещування і гібридизації є одним з методів підвищення генетичного потенціалу продуктивності риб. Цим зумовлена актуальність усебічного вивчення генетичних особливостей, насамперед наявних в Україні внутрішньопородних типів коропів, зокрема з використанням останніх досягнень і методів молекулярної генетики. Аналіз літератури свідчить, що генетичні особливості внутрішньопородних типів українських коропів та їхній зв'язок з різними аспектами продуктивності вивчено недостатньо [7].

Використання маркерних генів для контролю за генетичною структурою риб застосовують на практиці в рибництві багатьох країн [4, 10, 12]. Нині найактуальнішим завданням є розробка елементів геномної селекції в рибництві, що

передбачає практичні аспекти генетичного моніторингу. Одне з основних завдань генетичного моніторингу — це підтримка в стадах генетичного різноманіття, що є необхідною умовою для селекційної роботи. Розв'язання цих завдань потребує узагальнення світового досвіду і проведення спеціальних досліджень із застосуванням генетичних маркерів риб.

Використання ізоферментів як генетичних маркерів стало важливим механізмом контролю за генетичними процесами при створенні нових порід тварин [2]. Контроль передбачає ряд етапів: генетичну мінливість батьківських форм, зміни генних частот у кожному поколінні і ступені їх консолідації. Використання ізоферментів дає змогу прискорити процес перенесення генетичного матеріалу, пов'язаного з продуктивними ознаками тварин (наприклад, резистентність до захворювань), через створення помісей. Ефективність використання ізоферментів підвищується за збільшення кількості біохімічних маркерів.

У структурі українського лускатого і рамчастого коропів особливе місце належить антонінсько-зозуленецькому типу. З цих представників українських порід коропа виділились інші структурні типи. За основу цього типу взято коропів, плеємні стада яких створено під керівництвом А.І. Кузьоми впродовж 1922–1953 рр. Вони представлені двома формами: лускатою та рамчатою. З огляду на історію створення та великий масив цей тип є ядром українських

порід, їх еталоном. У своїй спадковій основі корої антонінсько-зозуленецького типу мають 50% спадкових задатків аборигенних лускатих і 50% дзеркальних галицьких короїв [8].

З 2003 р. спільно з працівниками Інституту рибного господарства НААН розпочато роботу з відродження історичного генофонду антонінсько-зозуленецького коропа [5]. Нині він є важливим об'єктом для проведення генетичного моніторингу в рибництві. Наявні в літературі дані про генетичні особливості антонінсько-зозуленецького типу фрагментарні і недостатні для широких узагальнень [6].

З метою вивчення особливостей і динаміки змін генетичної структури різних вікових груп лускатих та рамчастих короїв антонінсько-зозуленецького типу проведено аналіз розподілу алелів і генотипів за використання окремих генетико-біохімічних систем.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на 6 групах короїв різного віку: 1-річки (n=69), 2-річки (n=62) та 3-річки (n=20) лускатої і рамчатої порід короїв, яких відбирали у весняний період упродовж 2009–2011 рр. у БАТ «Хмельницькрибгосп» Хмельницької області.

Як молекулярно-генетичні маркери під час дослідження генетичної структури рамчастих і лускатих короїв вивчали розподіл алельних і генотипових частот за локусами, що кодують білки і ферменти, в крові риб. Генетичну структуру оцінювали за генетично детермінованим поліморфізмом 10 генетико-біохімічних систем: 18 локусів — трансферин (TF), альбумін (ALB), 2 локуси естерази (EST, КФ 3.1.1.1), карбоангідраза (CA, КФ 3.1.2), 2 локуси НАД-залежної малатдегідрогенази (MDH, КФ 1.1.1.37), 2 локуси НАДФ-залежної малатдегідрогенази (малік-ензим, ME, КФ 1.1.1.40), 2 локуси 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6-PGD, К.Ф. 1.1.1.43), супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1), каталаза (KAT, КФ 1.11.1.6), 5 локусів лактатдегідрогенази (LDH, К.Ф.1.1.1.27).

Кров у риб відбирали з хвостової вени піпетками Пастера у пластикові пробірки типу «Eppendorf». Як антикоагулянт використовували гепарин у розрахунку 25 МО на 1 мл крові. Відділяли плазму від еритроцитів центрифугуванням крові при 3 тис. об./10 хв. Зберігали зразки крові при 18°C.

Електрофоретичний аналіз білків плазми крові проводили в 11%-му поліакриламідному гелі [9], що дало змогу типувати на одній пластині гелю алелі локусів трансферину, альбуміну та естерази. Електрофоретичний аналіз ферментів еритроцитів проводили за допомогою горизонтального електрофорезу в крохмальному гелі [11] з подальшим гістохімічним фарбуванням і генотипуванням [1].

Математичну обробку даних (розрахунки генетичних відстаней, за методом М. Нея, оцінка генної рівноваги відповідно до закону Харді-Вайнберга, кластерний аналіз, дендрограма генетичних взаємовідношень) виконували за допомогою комп'ютерної програми «BIOSYS-1» [13].

Результати досліджень. Досліджено динаміку та особливості генетичної структури різновікових груп лускатих і рамчастих короїв з використанням 10 генетико-біохімічних маркерів. У результаті виконаного аналізу виявлено певні особливості розподілу частот алелів досліджених систем у короїв (табл. 1).

За локусом трансферину алельний варіант А трапляється у лускатих короїв з частотою від 0,088 у 1-річок, 0,016 у 2-річок до 0,100 у 3-річок. У рамчастих короїв алель Tf A наявний з частотою 0,114 та 0,100 у 1-річок і 3-річок відповідно, у 2-річок цей алельний варіант не виявлено (див. табл. 1). Алель Tf B у лускатих короїв траплявся з частотою 0,044–0,109, а в різних вікових груп рамчастих короїв його частота становила 0,029–0,183. У всіх вікових груп серед 5-ти виявлених алельних варіантів спостерігається висока концентрація алеля Tf C₁ і становить у лускатих короїв: 1-річок — 0,574, 2-річок — 0,563 і 3-річок — 0,500, у рамчастих короїв — відповідно 0,671; 0,700 і 0,600. Слід зазначити, що у лускатих короїв з віком дещо підвищується частота алеля Tf C₂ від 0,147 до 0,350, а у рамчастих навпаки — з віком частота цього алельного варіанта знижується: в 1-річок від 0,171 до 0,050 у 3-річок. Протилежна картина спостерігається за розподілом алельного варіанта D за локусом TF у різних вікових груп короїв. У лускатих короїв з віком частота алеля Tf D зменшується від 0,147 до 0,000, а в рамчастих — збільшується від 0,014 до 0,100 (див. табл. 1).

У зоні альбуміну спостерігаються породоспецифічні та вікові особливості. Відмінності виявлено у лускатих короїв. Так, у 1-річок переважає алель з низькою рухливістю Alb B (0,600), у 3-річок навпаки — частіше трапляється швидкий алельний варіант Alb A (0,600) (див. табл. 1).

У різних вікових груп рамчастого коропа частота обох алельних варіантів за локусом ALB майже не відрізняється.

Розподіл швидкого і повільного алелів за локусом естерази передбачає відмінності у 2-річок лускатого та 3-річок рамчастого короїв, у яких алельний варіант Est F значно переважає за частотою порівняно з алелем Est S. У інших вікових груп лускатих і рамчастих короїв обидва алелі локусу EST мають наближені значення і помітно не відрізняються.

За локусом малатдегідрогенази у всіх віко-

1. Особливості вікового розподілу алельних варіантів за локусами генетико-біохімічних систем у коропів антонінсько-зозуленецького типу

Локус	Коропи					
	лускаті			рамчасті		
	1-річки 2009 р.	2-річки 2010 р.	3-річки 2011 р.	1-річки 2009 р.	2-річки 2010 р.	3-річки 2011 р.
TF (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 ₁	0,574	0,563	0,500	0,671	0,700	0,600
C ₂	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
ALB (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
EST (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
MDH (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
ME (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
CA (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
SOD (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
KAT (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

вих груп лускатих і рамчастих коропів частота швидкого алеля Mdh F була значно вищою, ніж Mdh S. У лускатих коропів частота Mdh F становила 0,600–0,641, у рамчастих — 0,567–0,671.

За локусом малік-ензиму частота алельних варіантів Me F і Me S у всіх вікових груп помітно не відрізняється і коливається в близьких межах.

Виявлено вікові відмінності у груп лускатих і рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького типу за частотою алелів карбоангідрази. У ко-

ропів 2-річного віку, порівняно з коропами інших вікових груп, частота швидкого алеля Ca F є значно вищою, ніж Ca S, і становить у лускатих коропів 0,687, у рамчастих — 0,633. Відповідно частота повільного алельного варіанта — 0,313 та 0,367 (див. табл. 1).

У досліджених різновікових груп коропів не виявлено значних відмінностей за частотою швидкого і повільного алелів за локусом супероксиддисмутази, тобто частота цих алелів мала наближені значення, крім 3-річок лускатого коропа, у якого значно переважає швидкий

2. Рівень середньої гетерозиготності за дослідженими генетико-біохімічними системами в антонінсько-зозуленецьких коропів

Група	Локус H	TF	EST	MDH	ME	ALB	CA	SOD	KAT	H _{середня} за всіма локусами
<i>Лускаті коропи</i>										
1-річки	H _ф	0,647	0,471	0,700	0,588	0,800	0,794	0,800	0,829	0,704±0,045
	H _о	0,627	0,500	0,481	0,506	0,487	0,504	0,497	0,507	0,514±0,017
2-річки	H _ф	0,594	0,531	0,719	0,750	0,719	0,625	0,871	0,774	0,698±0,039
	H _о	0,592	0,448	0,468	0,500	0,496	0,437	0,506	0,482	0,491±0,017
3-річки	H _ф	0,500	0,800	0,800	0,900	0,800	0,700	0,700	0,700	0,737±0,042
	H _о	0,647	0,526	0,505	0,521	0,505	0,521	0,479	0,479	0,523±0,019
<i>Рамчасті коропи</i>										
1-річки	H _ф	0,371	0,686	0,600	0,600	0,857	0,771	0,829	0,829	0,693±0,058
	H _о	0,513	0,504	0,418	0,501	0,497	0,501	0,492	0,501	0,494±0,007
2-річки	H _ф	0,433	0,800	0,667	0,767	0,767	0,667	0,862	0,724	0,711±0,046
	H _о	0,476	0,508	0,499	0,503	0,503	0,472	0,506	0,499	0,496±0,005
3-річки	H _ф	0,600	0,400	0,700	0,400	0,700	0,600	0,700	0,600	0,587±0,044
	H _о	0,626	0,442	0,479	0,505	0,521	0,505	0,521	0,442	0,505±0,021

H_ф — фактична гетерозиготність; H_о — очікувана гетерозиготність.

алель Sod F і становить 0,650, на відміну від повільного алеля Sod S, який трапляється з частотою 0,350.

Установлено породоспецифічні та вікові особливості за локусом каталази. Зокрема, у лускатих коропів 3-річного віку виявлено більшу частоту алеля з низькою рухливістю Kat S (0,650), на відміну від рамчастих 3-річок, у яких, навпаки, з більшою частотою трапляється алель зі швидкою рухливістю Kat F (0,700). У 2-річок лускатого коропа частота алеля Kat F є вищою, ніж Kat S, і становить 0,613. У інших вікових груп коропів частоти швидкого та повільного алелів були в близьких межах.

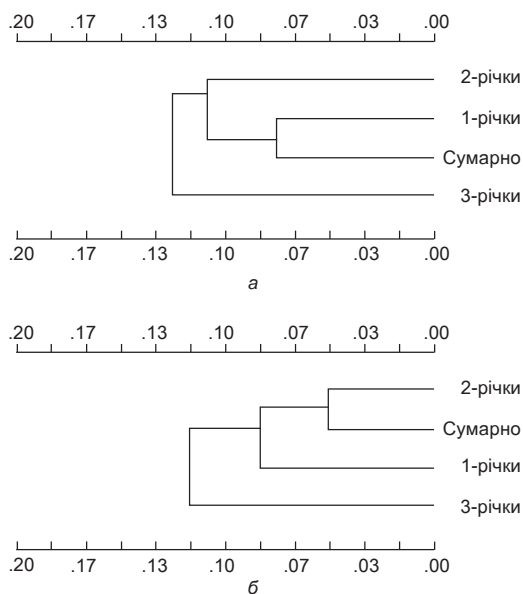
Під час вивчення генетичної структури популяцій тварин визначають його гетерогенність — значну кількість рецесивних мутацій, які в гетерозиготному стані не змінюють фенотипу і адаптивної здатності популяції загалом, але в гомозиготному стані впливають на виживання, тривалість життя і плодючість особин. Водночас навіть добре пристосована до умов існування популяція має прихований резерв впливу рівня гетерогенності, здатного знижувати адаптивні властивості особин. Тому визначення рівня гетерозиготності за кожним локусом і середньої гетерозиготності за всіма локусами у лускатих і рамчастих коропів є дуже важливим.

У лускатих коропів 1-річного віку за дослідженими генетико-біохімічними системами гетерозиготність, яку виявили, достовірно переважала очікувану через надлишок гетерозигот за локусами MDH (P<0,05), ALB (P<0,001), CA (P<0,001), SOD (P<0,001) і KAT (P<0,001) (табл. 2). У лускатих коропів 2-річного віку статистично достовірні відмінності між H_ф і H_о також виявлено за локусами MDH (P<0,01), ME (P<0,01), ALB (P<0,01), CA (P<0,05), SOD (P<0,001) і KAT (P<0,001), що свідчить про невірноважений стан генетичної структури цих груп риб за дослідженими локусами (табл. 2).

У 3-річок лускатого коропа лише за локусом ME виявили надлишок гетерозиготних особин FS (90%) згідно з Харді-Вайнбергом (P<0,05), тому фактична гетерозиготність достовірно відрізнялася від очікуваної.

Слід зазначити, що у лускатих коропів усіх вікових груп лише за локусами TF і EST, а також у коропів 3-річного віку за іншими дослідженими локусами, крім ME, достовірних відмінностей за рівнем фактичної та очікуваної гетерозиготності не виявлено.

У 1-річок рамчастих коропів надлишок гетерозигот, що призвів до підвищення рівня фактичної гетерозиготності порівняно з очікуваною, виявлено за локусами EST (P<0,05), MDH



Дендрограма генетичних взаємовідношень вікових груп короїв: а — лускатих; б — рамчастих

($P < 0,05$), ALB ($P < 0,001$), CA ($P < 0,001$), SOD ($P < 0,001$) і KAT ($P < 0,001$). У короїв 2-річного віку вищий рівень фактичної гетерозиготності завдяки статистично достовірному надлишку гетерозигот спостерігався за локусами EST ($P < 0,001$), ME ($P < 0,01$), ALB ($P < 0,01$), CA ($P < 0,05$), SOD ($P < 0,001$) і KAT ($P < 0,05$) (див. табл. 2).

За фактичним та очікуваним рівнем середньої гетерозиготності за всіма дослідженими локусами лише рамчасті корої 3-річного віку виявились у врівноваженому стані.

Отже, вивчення частоти алельних варіантів за дослідженими локусами дало змогу оцінити мінливість генетичної структури в часі за конкретною ділянкою геному, а визначення значення гетерозиготності — охарактеризувати ці локальні популяції за рівнем генетичної мінливості. Аналіз генетичного різноманіття за поліморфними системами білків свідчить, що цілеспрямований добір тварин на збільшення

продуктивних якостей підвищує рівень гомозиготності в окремих груп короїв.

Генетичні відстані між дослідженими групами риб, розраховані на основі генетичних дистанцій (М. Nei, 1978), свідчать про міжгрупові відмінності у досліджених короїв.

На основі індексу ідентичності побудовано дендрограми, які дають змогу оцінити генетичну спорідненість різновікових груп досліджених порід короїв (рисунки).

Слід зазначити, що групи лускатих короїв розподілилися за дослідженими генетико-біохімічними системами, утворюючи відповідні кластери (рис., а). Генетична структура короїв 1-річного віку робить найбільший внесок у формування структури дослідженої популяції лускатих короїв, 2-річки дещо відрізняються від них і утворюють інший кластер. Найбільш віддаленими від інших груп за генетичною структурою виявились лускаті корої 3-річного віку, які утворюють свій незалежний кластер. На дендрограмі група 3-річок найбільш віддалена від групи лускатих короїв 1-річного віку і дещо менші ці відмінності від короїв 2-річок (див. рис., а).

У рамчастих короїв спостерігається певна специфіка розподілу між дослідженими групами (рис., б). Так, рамчасті корої 3-річного віку помітно відрізняються від інших вікових груп.

Групи 3-річного віку лускатих і рамчастих короїв характеризуються певними генетичними особливостями. Причиною такої диференціації, можливо, є значний вплив факторів штучного добору.

Отже, на основі сукупності отриманих даних (величин генетичних відстаней і результатів кластерного аналізу) розподіл алельних частот у досліджених українських лускатих і рамчастих короїв антонінсько-зозуленецького типу свідчить про генетичну неоднорідність за цілим рядом білків і ферментів. Генетична структура груп лускатих і рамчастих 3-річок короїв певним чином відрізняється від інших вікових груп. Мінливість генетичної структури в часі за конкретною ділянкою геному і з'ясування значення гетерозиготності дало змогу охарактеризувати цю локальну популяцію за рівнем генетичної мінливості.

Висновки

Вперше охарактеризовано генетичну структуру груп лускатих і рамчастих короїв антонінсько-зозуленецького типу різного віку.

Виявлено полі- та мономорфізм генетико-біохімічних систем крові і визначено можливість їх використання для оцінки генетичних

зрушень у породі. Вивчено міжпородну та внутрішньопородну мінливість розподілу алельних варіантів білків і ферментів залежно від віку.

Результати проведених досліджень мають принципове значення для подальшого вдоско-

налення теоретичних і практичних методів створення нових генетичних типів українських коропів, що найбільше відповідають агрокліматичним умовам зони їх розведення.

Дослідження гетерозиготності в групах

коропів дало змогу простежити за динамікою показників їх генетичного різноманіття, спостережуваного впродовж кількох років. Зроблено висновок, що рівень гетерозиготності не залежить від гетерогенності популяцій.

Бібліографія

1. Генетика изоферментов/[Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др.]. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
2. Генетика, селекція і біотехнологія в скотівстві/[М.В. Зубец, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник и др.]; под ред. М.В. Зубца, В.П. Бурката. — К.: БМТ, 1997. — С. 599–702.
3. Гринжєвський М.В. Оптимізація виробництва продукції аквакультури/М.В. Гринжєвський, А.В. Пекарський. — К.: Поліграф Консалтинг, 2004. — 328 с.
4. Калашникова Л.А., Дунин І.М., Глазко В.І. Селекція ХХІ століття: використання ДНК-технологій. — Изд. ВНИИплем, 2000. — 31 с.
5. Коцюба В.М. Стан і перспективи розвитку рибогосподарської діяльності ВАТ «Хмельницьк-рибгосп»/В.М. Коцюба, М.М. Горбач/[Оптиміальне використання, збереження і відтворення водних живих ресурсів — нагальні завдання товаровиробників рибопродукції та наукових установ рибної галузі: матеріали наук.-практ. семінару, 12 червня 2009 р., «FishExpo-2009». — К.: НТУУ «КПІ», 2010. — С. 61–65.
6. Олексієнко О.О. Антонінсько-зозуленецький тип — структурна ланка українських порід коропа/О.О. Олексієнко/[Таврійський наук. вісн. — 2004. — Вип. 32. — С. 157–164.
7. Організація селекційно-плеїнної роботи в рибництві/[М.В. Гринжєвський, І.М. Шерман, І.І. Грициняк та ін.]; за ред. М.В. Гринжєвського, І.М. Шермана. — К.: Рибка моя, 2006. — 352 с.
8. Фермерське рибництво/[І.І. Грициняк, М.В. Гринжєвський, О.М. Третяк та ін.]. — К.: Герб, 2008. — 560 с.
9. 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.
10. Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations/A. Perez-Ruza, M. Gonzalez-Wanguemert, P. Lenfant [et al.]/Biological conservation. — 2006. — № 129. — P. 244–255.
11. Harris H. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics/H. Harris, D.A. Hopkinson. — Amsterdam: North-Holland Publ. Comp., 1976. — 680 p.
12. Population genetic structure of a nonmigratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination/S.A. Roark, D. Nacci, L. Coiro [et al.]/Environmental Toxicology and Chemistry. — 2005. — V. 24, Issue 3. — P. 717–725.
13. 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.