

На правах рукописи

Демкина Наталья Викторовна



**БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ И  
РАЗВЕДЕНИИ КАРПОВЫХ И ОСЕТРОВЫХ РЫБ**

03.00.10 - ихтиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Рыбное 2005

Работа выполнена в лаборатории генетики и селекции Всероссийского научно-исследовательского института пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

**Официальные оппоненты:**

доктор сельскохозяйственных наук Привезенцев Юрий Алексеевич

доктор биологических наук Волчков Юрий Андреевич

доктор биологических наук Никоноров Сергей Иванович

Ведущая организация: Московское отделение Федерального селекционно-генетического центра

Защита диссертации состоится 15 марта 2005 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 307.003.01 при Федеральном Государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства» по адресу: 141821, Московская область, Дмитровский район, п. Рыбное.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИПРХ.

Автореферат разослан «12» февраля 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Подоскина Т.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Задача увеличения производства и расширения ассортимента рыбной продукции требует выведения новых пород традиционных объектов аквакультуры, таких, как карп, и domestikации "диких" видов, в том числе создания племенных стад осетровых рыб, зачастую уже не воспроизводящихся в природе. В Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (2003 г.) внесено 12 пород и типов карпа, 6 пород форели, 3 породы толстолобиков, 1 - тилипии, 3 породы бестера. В качестве породы "одомашненная форма", что возможно лишь для объектов рыбоводства, представлены белый и черный амур, белуга, веслонос, пелядь, стерлядь, сибирский и русский осетры. В описании каждой породы представлена генетическая характеристика этой группы рыб.

Особое значение в настоящее время приобретает создание коллекционных стад осетровых рыб и сохранение в них всего имеющегося спектра генетической изменчивости. Обеднение генофонда может привести к исчезновению охраняемых видов. С другой стороны, генофонды природных популяций могут стать источником ценного материала для выведения пород одомашненных осетровых и товарного разведения. Обеднение генофондов приводит к утере желательных свойств культурных пород рыб, снижению приспособленности в диких популяциях.

Появление многочисленных работ по изучению биохимического полиморфизма объектов аквакультуры продиктовано необходимостью оценить генетический потенциал существующих групп (Кирпичников, 1987). Использование электрофоретических вариантов полиморфных белков в качестве генетических маркеров позволяет идентифицировать отдельные популяции, маркировать стада, отводки или потомства индивидуальных скрещиваний, выявлять родственные связи между группами, следить за изменениями, происходящими в процессе селекции, эксплуатации, акклиматизации или domestikации различных групп рыб.

**Цель исследования:** изучить возможности использования продуктов белковых и ферментных локусов в качестве биохимических маркеров в селекции и разведении карповых и осетровых рыб.

В задачи исследования входило следующее:

- 1) выбор биохимических маркеров для проведения генетического мониторинга в племенных группах карпа и сазана (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758);
- 2) изучение генотипического и аллельного разнообразия различных породных групп карпа (московского чешуйчатого и разбросанного, ангелинского чешуйчатого и разбросанного, селекционных групп среднерусского карпа, немецкого, тремлянского, лахвинского карпов);
- 3) использование данных биохимического тестирования для выявления засорения в маркированных отводках карпа и сазана;
- 4) анализ изменений в генетической структуре селекционных групп карпа в процессе селекции;
- 5) изучение влияния процесса криоконсервации спермы рыб на полностью воспроизведения генетической гетерогенности групп;
- 6) оценка возможности использования полиморфных и видоспецифичных мономорфных белковых и ферментных систем у белого (*Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) и пестрого (*Aristichthys nobilis* (Richardson, 1846) толстолобиков;
- 7) поиск биохимических маркеров у веслоноса (*Polyodon spathula* (Walbaum, 1792) и описание биохимического полиморфизма его стад;
- 8) выявление биохимических маркеров сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), пригодных для генетического мониторинга племенных стад и изучение характера их наследования;
- 9) выявление биохимических маркеров стерляди (*Asipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), пригодных для генетического мониторинга племенных стад и изучение характера их наследования.

**Научная новизна.** Проанализированы и обобщены многолетние данные по частотам аллелей полиморфных белковых локу-

сов в различных селекционных группах карпа. Выявлены изменения генетической структуры как внутри селекционных поколений среднерусского карпа, московских и ангелинских чешуйчатых и разбросанных карпов, так и в процессе селекции каждой из этих пород. Проведено сравнение изменений генотипической структуры в различных породных группах карпа и поиск связи этих изменений с условиями проведения отбора. Показано, что снижение генетической изменчивости в селекционных группах среднерусского карпа обусловлено, в первую очередь, генетическим дрейфом при малой эффективной численности маточных стад.

Продемонстрирована возможность использования биохимических маркеров для выявления "засорения" племенного материала карпа, белого и пестрого толстолобиков.

Впервые описан полиморфизм систем, пригодных для прижизненного тестирования у веслоноса: сывороточных альбуминов и эстераз. Отмечены различия по частотам генотипов и аллелей, вызванные генетическим дрейфом, в группах веслоноса, разводимого в разных хозяйствах Краснодарского края. Показано, что у производителей веслоноса НПЦ "Биос" сохранились все известные аллели двух полиморфных локусов, то есть поддерживается весь спектр генетической изменчивости.

Описаны полиморфные ферментные системы сибирского осетра и стерляди. Впервые проведен гибридологический анализ наследования этих систем. Предложен набор полиморфных белковых локусов, которые можно использовать в работах по генетическому мониторингу заводских стад сибирского осетра и стерляди с применением прижизненного тестирования рыб весом более 100 г.

Проанализированы различия в требованиях к проведению генетического мониторинга в природных популяциях рыб, при селекционных работах и работах по разведению и доместикации новых видов. Определены критерии выбора биохимических маркеров. Проведен гибридологический анализ наследования аллелей полиморфных локусов у карпа, белого и пестрого толстолобика, сибирского осетра и стерляди.

**Практическая значимость.** В течение 27 лет (с 1976 по 2004 год) осуществлен контроль за "чистотой" маркированных племенных отводок среднерусского карпа с помощью прижизненного тестирования этих групп по биохимическим маркерам. На ЦЭБ ВНИИПРХ "Якоть" заложена генетически маркированная (генами чешуйного покрова  $S$  и  $n$ , а также нулевым аллелем локуса  $Mu-3$ ) линия амурского сазана. Обоснована необходимость большой эффективной численности племенных групп рыб для поддержания исходной генетической изменчивости групп и сохранения редких аллелей (использование нескольких десятков производителей в каждом селекционном поколении). Получены данные по отсутствию сцепления между мноморфными видоспецифичными локусами, используемыми в качестве биохимических маркеров у белого и пестрого толстолобиков, что повышает возможность определения межвидовых гибридов второго поколения до 99%. С помощью биохимических маркеров выявлены межвидовые гибриды между белым и пестрым толстолобиком в отделении "Белоозерское" рыбхоза "Селец" Республики Беларусь. На основании результатов диссертационной работы разработаны и опубликованы рекомендации "Использование биохимических маркеров в генетических исследованиях и селекции растительноядных рыб" и методические указания по использованию биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад карпа, сибирского осетра и стад стерляди (2001).

**Апробация работы.** Результаты исследований по теме диссертации были представлены на коллоквиумах лаборатории генетики и селекции (1977-2001 гг.), на отчетных сессиях научно-методического и ученого советов ВНИИПРХ (1995-2004 гг.), на Всесоюзной конференции молодых ученых "Научно-технический прогресс и проблемы рыбного хозяйства" (Москва, 1978), на 2-м Всесоюзном совещании по биохимической генетике, кариологическому полиморфизму и мутагенезу у рыб (Ленинград, 1978), на 2-м и 3-м Всесоюзных совещаниях по генетике, селекции и гибридизации рыб (Ростов-на-Дону, 1981 и Тарту, 1986), на VI съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (Минск, 1992), на 3-й международной ихтиогематологической конференции (Lytomysl, 1993), на научно-методической международной конференции "Современная аквакультура: проблемы обра-

зования и освоения новейших технологий" (Рыбное, 1996), на I Конгрессе ихтиологов России (Астрахань, 1997), на международном совещании по проблемам рыбоводства (Минск, 1998), на 1-й научно-практической конференции "Проблемы современного товарного осетроводства" (Астрахань, 1999), на 2-м международном симпозиуме "Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре (Адлер, 1999), на IX Всероссийской конференции "Экологическая физиология и биохимия рыб" (Ярославль, 2000), на международной научно-практической конференции "Аквакультура начала XXI века" (Рыбное, 2002).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, в том числе 4 методических разработки и 1 авторское свидетельство.

**Структура и объем диссертации.** Рукопись диссертации состоит из введения, 10 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на стр. машинописного текста, содержит **36** таблиц, **22** рисунка. В списке литературы **334** источников, из них **308** на русском языке.

**Глава 1.** Использование биохимических маркеров в разведении и популяционных исследованиях рыб (обзор литературы).

В качестве биохимических маркеров разных видов рыб обычно используют электрофоретические варианты белков, обусловленные разными аллелями одних и тех же генов. То есть, исследуют белковые продукты полиморфных локусов. При определении принадлежности к тому или иному виду (или при выявлении межвидовых гибридов) в качестве маркеров могут быть использованы мономорфные видоспецифичные белки и ферменты. Электрофоретический анализ основан на том, что различные белки отличаются друг от друга молекулярным весом, структурой, формой молекул, величиной поверхностного электростатического заряда. В связи с этим разные белки перемещаются в однородном электрическом поле с различной скоростью, т.е. обладают неодинаковой подвижностью (Маурер, 1971).

Гистохимическое окрашивание блоков гелей, проводимое после окончания электрофореза, позволяет получить электрофореграммы в виде наборов полос (фракций), соответствующих различным белкам (Корочкин и др., 1977). При этом выявленные белки могут быть мотоморфными (не подверженными индивидуальной изменчивости) или полиморфными. Генетический характер наблюдаемого полиморфизма может быть подтвержден только проведением гибридологического анализа (постановкой индивидуальных скрещиваний), поскольку кроме генетической обусловленности, наблюдаемая индивидуальная изменчивость может быть возрастной, сезонной, а также относящейся к случаям конформационных (ненаследственных) изменений или к псевдополиморфизму (например, вызванному протеолизом) (Безруков, 1987).

Высокая гетерозиготность полиплоидного организма обеспечивает ему большую экологическую пластичность, стабильность онтогенетического развития. Нужно, вероятно, говорить о границах оптимальной гетерозиготности (Алтухов, 1989; Алтухов и др., 1991; Духарев и др., 1987). Средний уровень гетерозиготности популяции по всем локусам обычно не превышает 0,3 независимо от величины эффективной численности (Кимура, 1985).

Имеются определенные трудности в интерпретации электрофоретических картин у полиплоидных видов. Они связаны с дубликацией локусов, кодирующих тот или иной фермент, вследствие увеличения плоидности. Однако, в процессе последующей эволюции часть дублицированных локусов подвергалась вторичной диплоидизации. В результате в геноме некоторых рыб встречаются как дублицированные, так и недублицированные локусы. Отмечено, что более примитивные виды (например, осетровые) имеют тенденцию сохранять больше дублицированных локусов, в то время как виды, эволюционно более молодые (карповые), обнаруживают диплоидизацию - потерю экспрессии многих дублицированных генов, то есть вместо продуктов четырех генов мы видим активные продукты двух генов. Предполагается, что она обусловлена фиксацией нулевых аллелей как структурных, так и регуляторных генов.

Перспективы применения данных биохимической генетики в аквакультуре различны. Это:

- выявление межвидовых гибридов (Бурлаков и др., 1973; Паюсова, Целикова, 1983; Паюсова, Шубникова, 1986; Семенова, Слынько, 1986, 1988; Черфас, Трувеллер, 1978; Vuorinen et al., 1988 и др.);
- установление филогенетических связей отдельных видов и популяций рыб (Коваль, 1988; Осин, 1990а; Callegarini, 1978; Ferguson, 1989; Renaud et al., 1986 и др.);
- изучение внутривидовой изменчивости по частотам аллелей и генотипов (Алтухов и др., 1983, 1987; Бойко, 1997; Гагальчий, 1986 а,б; Кирпичников, 1978; Кирпичников, Муске, 1981; Ненашев, Тихомирова, 1987; Паюсова, Целикова, 1986; Салменкова и др., 1989; Beardmore, Ward, 1978; Mitton, Koehn, 1975 и др.);
- изучение антропогенного влияния на промысловые стада рыб; влияние промысла и искусственного воспроизводства (Андрияшева, 1987; Никоноров и др., 1989; Рябова, 1984; Чихачев, Цветненко, 1984; Ferguson, 1989; Koljonen, 1989; Sugama et al., 1988; Taggart, Ferguson, 1986.);
- генетический мониторинг изменений, происходящих в процессе селекции, акклиматизации, доместикации (Андрияшева, Локшина, 1987; Бружинская, Жалюнене, 1978; Галаган, 1973; Гросс и др., 1989а; Локшина, Андрияшева, 1981; Паюсова, Целикова, 1986; Щербенок, Зонова, 1986; Slechtová et al., 1998);
- генетическое маркирование стад и линий (Катасонов и др., 1980; Смишек, 1978; Щербенок, 1986; Brody et al., 1976; Kalal, 1977; Moav et al., 1976; Sraisek, 1973; Valenta et al., 1985);
- поиск корреляций генотипов полиморфных локусов с хозяйственно ценными признаками. Подобные исследования проведены на карпе (Балахнин, Соломатина, 1970), форели (Reinitz, 1977), белого амура (Безруков, 1987в), фундулюса (Powers et al., 1979), кижуча (Mc Intyre, Jonson, 1977), нерки (Варнавская, Дубынин, 1987), севрюги (Чихачев, 1985), пеляди (Андрияшева, 1989) и многих других видов. Установлена положительная корреляция между уровнем гетерозиготности и плодовитостью, длиной тела, скоростью роста, жизнеспособностью, отрицательная корреляция между гетерозиготностью и вари-

бильностью морфологических признаков (Leary et.al., 1983; Локшина и др., 1987; Картавцев и др., 1990; Калнин, Калнина, 1991; Пак,1991).

Биохимический полиморфизм карповых рыб изучен достаточно хорошо. Наибольшее число работ посвящено описанию полиморфных белковых локусов у карпа ((Балахнин, Галаган, 1973; Кирпичников, 1987; Кишш, 1979; Паавер, 1983; Пак, 1991; Сапрыкин 19796, 1980а, 1985а; Щербенок, 1986; Brody et al., 1979; Creyssel et al., 1964,1966; Valenta et al., 1976 и многие другие), сазана (Паавер, 1979,1983), белого и пестрого толстолобиков (Ненашев, Рыбаков, 1976,1978; Паюсова и др., 1979,1988а; Чихачев и др., 1980; Безруков, Бердышев, 1983 и т.д), серебряного карася (Бельченко, Глазко, 1985; Чернова и др., 1987), буффало (Куринный, 1984; Паюсова и др., 1989).

Изучению популяционной генетики лососевых, сиговых и хариусовых рыб посвящено большое количество многолетних исследований (Алтухов, Варнаевская, 1983; Алтухов и др., 1987, 1997; Андрияшева и др., 1983; Гагальчий, 1986; Голованова и др., 1997а, 2000; Животовский и др., 1987; Макоедов,1999; Осинев, 1988; Павлов, 2000; Рябова1977; Салменкова и др., 1989; Семенова, Слынько, 1987, 1988 и др.).

Отечественные работы по генетическому мониторингу осетровых относятся в большинстве своем к исследованию естественных популяций на основе изменчивости сывороточных белков или гемоглобинов (Гераскин, 1986; Кузьмин, Лукьяненко, 1982, 1984; Лукьяненко, Лукьяненко, 1988; Лукьяненко и др., 1969, 1971, 2002 и др.), полиморфные ферментные локусы изучены у севрюги (Рябова и др., 1984; Серов, Никоноров, 1988), русского осетра (Цветненко и др., 1987; Кузьмин, Кузьмина, 1987) и ряда других (Кузьмин, 1991).

Возможность использования биохимических маркеров для идентификации различных групп рыб или установления степени их близости обсуждалась не раз (Богданов и др., 1989; Глазко, 1985). В целях идентификации возможно и применение системного анализа изменчивости фенотипов (Тюрин и др., 2002). Новым этапом стало применение ДНК-технологий в идентификации генотипов, выявлении

генетических маркеров популяций и видов (Барминцев, 2000; Голованова и др., 2001).

Необходимо отметить, что при изучении биохимического полиморфизма природных популяций рыб для сбора проб обычно используют выборки достаточно большой численности, безвозвратно изымаемые из обследуемого стада. Исследуют обычно ферменты, экспрессирующиеся в различных органах и тканях (мышцы, печень, сердце, хрусталик глаза). Кровь, как правило, не используют, так как это значительно затрудняет сбор материала. При проведении генетического мониторинга племенных стад объектов пресноводной аквакультуры ввиду относительно небольшой численности и высокой ценности племенных рыб обычно приходится ограничиваться прижизненным сбором проб, что требует использования в исследованиях, в первую очередь, полиморфных систем, продукты которых можно выявлять в крови (сыворотке и эритроцитах), а также в мышцах. В связи с этим перечни полиморфных систем, используемых в популяционных исследованиях или при организации генетического мониторинга процессов разведения, селекции, доместикации могут значительно отличаться.

## Глава 2. Материал и методы исследований.

Работу проводили в лаборатории генетики и селекции ВНИИПРХ в 1976-2004 гг.

Материалом для изучения послужили карпы различных породных групп, белый и пестрый толстолобики, веслонос, сибирский осетр и стерлядь. Отводки среднерусского карпа, а также немецкий карп, амурский сазан, потомки японских цветных карпов были исследованы на центрально-экспериментальной базе (ЦЭБ) ВНИИПРХ "Якоть", начиная с 1976 г. В 1980 г. сюда же из рыбхоза "Пара" Рязанской обл. личинками были завезены парские карпы, их дальнейшая селекция была направлена на создание внутривидовых типов "Московский чешуйчатый" и "Московский разбросанный". Сбор проб сыворотки крови ангелинских карпов осуществляли на Ангелинском опытном участке ВНИИПРХ Краснодарского края. Местом изучения белорусских карпов были выбраны рыбхозы "Лахва" и

"Тремля", где проводили направленную селекционно-племенную работу с этими группами (Таразевич, Илясов, 1992). Белый и пестрый толстолобик были исследованы на рыбопроизводном заводе "Горячий Ключ" Краснодарского края и в отделении "Белоозерское" рыбхоза "Селец" Республики Беларусь. Изученные пробы тканей веслоноса были собраны в хозяйстве "Горячий Ключ", специализированном рыбопроизводном заводе растительноядных рыб (СРЗРР) Краснодарского края, а также в хозяйстве "Биос" Астраханской обл. Сибирского осетра и стерлядь исследовали на Конаковском заводе товарного островодства (КЗТО), где созданы коллекционные стада сибирского осетра ленской, байкальской и обской популяций, различных популяций стерляди. Общий объем собранного и изученного материала представлен в таблице 1.

Соотношение количества исследованных рыб и взятых проб демонстрирует проведение прижизненного мониторинга селекционного материала. Исследовали в основном пробы крови, реже - пробы белых скелетных мышц. Сбор проб сыворотки крови и мышц осуществляли, используя типовые методики (Лиманский и др., 1986, Паюсова и др., 1988), перевозили пробы в термосах или сосудах Дюара со льдом, хранили при температуре от -4 до -18 С°.

Анализ полиморфных белковых локусов карпа, сазана, веслоноса, проводили методом вертикального диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по прописям Дэвиса (1964) с некоторыми модификациями. Пользовались камерой конструкции К.А. Трувеллера и Г.Н.Нефедова (1974). Кроме того, при анализе экстрактов тканей сибирского осетра и стерляди использовали электрофорез в ПААГе по методу Пикока (Peacock et al., 1965), часть ферментов выявляли горизонтальным электрофорезом в блоках гидролизованного крахмала (Smithies, 1955) в непрерывной (Clayton, Tretiak, 1972) или прерывистой (Ridgeway et al., 1970) буферных системах.

Окраску на белки и ферменты проводили, используя типовые методики (Салменкова, Малинина, 1976). Гели отмывали и хранили в 7% уксусной кислоте.

Критериями выбора биохимических маркеров для генетического мониторинга племенных групп рыб для нас являлись (по степени важности):

- 1) возможность прижизненного сбора проб;
- 2) отсутствие индивидуальной сезонной и возрастной изменчивости по данному локусу;
- 3) наличие данных гибридологического анализа о характере наследования продуктов данного локуса;
- 4) возможность одновременного получения электрофоретических спектров продуктов двух и более полиморфных локусов в параллельных пластинах геля;

Таблица 1. - Объем изученного материала.

Название группы (вида) рыб	Годы иссле- дова- ния	Количество изученных				
		поколе- ний селек- ции	гене- раций	рыб, шт.	проб, шт.	ЭФ спек- тров, шт.
Среднерусский карп	1976- 2003	6	30	2631	3423	7087
Московский (парский) карп	1986- 2003	5	12	990	1271	3799
Ангелинские (крас- нодарские) карпы	1976- 2003	7	20	1721	2593	4826
Другие группы карпа	1977- 1999	2	25	2300	2517	4127
Амурский сазан	1976- 2003	-	5	603	996	1872
Белый толстолобик	1988- 1998	-	4	176	203	284
Пестрый толстолобик	1988- 1998	-	9	309	566	1389
Веслонос	1990-96, 2000	-	9	398	398	796
Сибирский осетр	1997- 2004	-	6	636	964	4692
Стерлядь	1998- 2004	-	5	601	832	5607
Итого	1976- 2004	20	125	10375	13673	34479

- 5) отсутствие псевдополиморфизма (возникает при широкой субстратной специфичности);
- 6) невысокая стоимость реактивов для выявления ферментных и белковых продуктов полиморфных локусов;
- 7) относительная простота идентификации генотипов.

Полиморфные и мономорфные белковые и ферментные системы сокращенно обозначали прописными буквами. Указывая их локусы, буквосочетание выделяли курсивом, первая буква в таком случае была прописной, остальные - строчными.

Список обозначений основных исследованных белковых и ферментных систем и локусов:

ALB, *Alb* - альбумин;

APH, *Aph* - щелочная фосфатаза;

GPI, *Gpi-1,2* - глюкозо-6-фосфатизомераза;

EST, *Est-1, Est-2*-неспецифическая эстераза;

LDH, *Zdh*-лактатдегидрогеназа;

MDH, *Mdh -B1, Mdh -B2* - малатдегидрогеназа;

MY, *My-3* - миогены;

PGDH, *Pgdh-1,2* - 6-фосфоглюконатдегидрогеназа;

PGM, *Pgm-2,3* - фосфоглюкомутаза;

PRALB, *Pralb* -преальбумины;

SOD, *Sod* - супероксиддисмутаза;

TF, *Tf*- трансферрин.

Аллели полиморфных локусов обозначали буквами латинского алфавита (карп, веслонос) или цифрами (сибирский осетр, стерлядь) и размещали надстрочным индексом рядом с названием аллеля (например, *Tf<sup>1</sup>*, *Pgm-4<sup>1</sup>*). Генотипы (фенотипы) обозначали буквами или цифрами - AA, Aa, 12,22.

При оценке распределения частот генотипов и аллелей в селекционных и племенных группах рыб не проводили сравнения с теоретически ожидаемым в соответствии с формулой Харди-Вайнберга

распределением поскольку изучаемые группы не соответствовали ни одному из введенных авторами ограничений - не имели большой численности, у них отсутствовала панмиксия, всегда подвергались действию отбора и т.л.

Статистическую обработку материалов, построение графиков и диаграмм проводили с использованием программы Microsoft Excel, 2000.

### Глава 3. Биохимический полиморфизм стад карпа и сазана.

Для оценки генетической изменчивости стад карпа, по нашему мнению, достаточно использовать даже относительно небольшое число высокополиморфных локусов (от 4 до 8 аллелей на локус, 18 степеней свободы для предложенного набора из 4 локусов).

Приведено описание биохимического полиморфизма по четырем полиморфным локусам - трансферрина (*Tf*), двух локусов эстеразы (*Est-1*, *Est-2*) и миогенов (*Mu-3*) различных селекционных (среднерусские, московские, ангелинские, тремлянские, лахвинские) и коллекционных (немецкие, гибриды с японскими) групп карпа, а также амурского сазана, выращенного на ЦЭБ "Якоть".

Исключительно высока генетическая изменчивость карпов и сазанов по локусу трансферрина. Максимальное количество - девять аллелей *Tf* обнаружено у амурского сазана. Основными из них являются *u*,  $\xi$ , *a*, *B*, *c*, *d*, *e*, а также аллели с промежуточной подвижностью *d'*, *e'*, обозначаемые иногда как *a'* и *c'*. По некоторым данным, с учетом промежуточных вариантов, число выделяемых фракций трансферрина еще больше (до 20) (Сапрыкин, 1985; Щербенок, Галанов, 1985), однако гибридологический анализ наследования был проведен не для всех электрофоретических вариантов с промежуточной подвижностью. У культурных карпов, прошедших длительный отбор и не скрещивавшихся с амурским сазаном (немецкие, галицийские, карпы фресинет), встречаются только три аллеля *Tf*- *a*, *B*, *c* (рис.1).

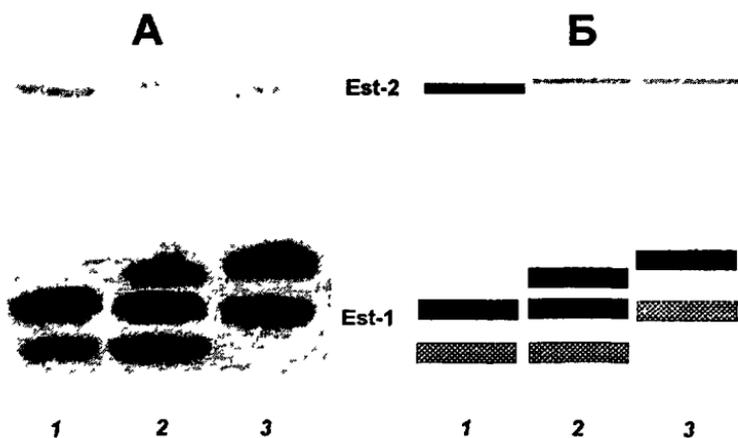
В сыворотке крови и мышцах карпа активен локус *Est-1*. В настоящее время выявлено 4 аллеля локуса *Est-1* - *a*, *B*, *c*,  $\xi$  (Трувеллер и

др., 1974; Щеглова, Илясов, 1979; Демкина, 1993) (рис.2). В мышцах проявляется и другой локус эстераз с меньшей электрофоретической



ской

Рис. 1. Электрофореграмма (А) и схема (Б) трансферринов карпа. Генотипы: 1 - СС, 2 - AD, 3 - AC, 4 - CC (видно наложение альбуми-



нового пятна на зону трансферрина), 5 - ВС, 6 - ВВ.

Рис.2. Электрофореграмма (А) и схема (Б) фракций эстераз: генотипы: *Est-1*: 1 - AA, 2 - АВ, 3 - СС; *Est-2*: 1 - ВВ, 2 - С0, 3 - С0.

■ - фракция - продукт гена,

▨ - фракция - "тень".

подвижностью (*Est-2*), в котором найдено 4 аллеля, в том числе и нулевой аллель (Московкин и др., 1973; Черфас, Трувеллер, 1978; Паавер, 1983) (рис.2). Эстераза-I карпа (*Est-1*) является термо нестабильной системой и даже непродолжительное хранение приводит к образованию минорных фракций - "теней" в результате разрушения молекул фермента.

Миогены (*My3*). Существование двухаллельной системы (*My-3<sup>A</sup>* и *My-3<sup>a</sup>*) в третьей зоне миогенов впервые было показано группой сотрудников МГУ (Трувеллер и др., 1973). Доминантный аллель *My-3<sup>A</sup>* обуславливает образование белковой фракции в зоне *My-III*, а рецессивный аллель *My-3<sup>a</sup>* является нулевым - то есть белковая фракция отсутствует (рис.3).

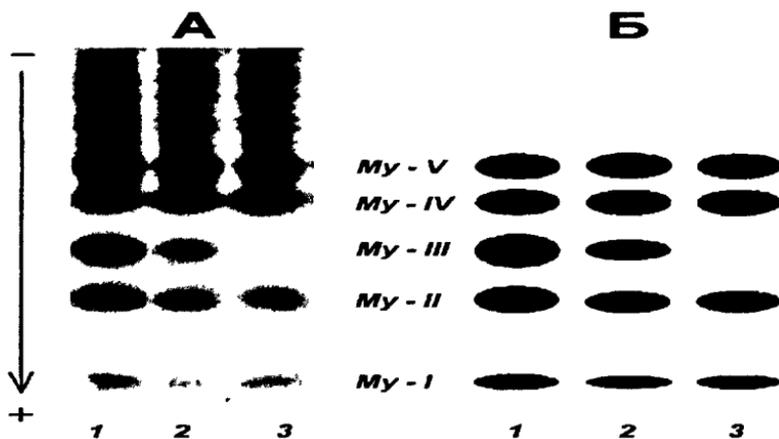


Рис. 3. Электрофореграмма (А) и схема (Б) фракции миогенов. Генотипы (*My-III*): 1 - AA, 2 - Aa, 3 - aa (гомозигота по нулевому аллелю).

Гетерозигота Aa в зоне *My-III* отличается от гомозиготы AA меньшей интенсивностью фракции. Причиной частого использования системы миогенов стала значительная географическая изменчивость сазана по частотам аллелей этого локуса.

Обычно для оценки уровня генетической изменчивости применяют три критерия: долю полиморфных генов (P), среднюю гетерозиготность особи, рассчитанную на один локус (h), и среднее число аллелей на локус (Ä). Использовать долю полиморфных локусов как характеристику генетической изменчивости локальных стад карпа - прием едва ли эффективный, так как список полиморфных локусов - характеристика вида в целом и вряд ли будет сильно меняться внутри его. Среднюю гетерозиготность для этих же целей можно применять только с учетом возраста исследованных рыб (см. гл.5). Использование числа аллелей высокополиморфных локусов как характеристики генетической гетерогенности более показателен.

Среднерусский карп. Работы по созданию породы среднерусского карпа начаты в 1963 г. (Головинская, 1969) на принципах синтетической селекции. Отводки среднерусского карпа являются потомками четырех карповых групп: украинских (У), нивских (Н), курских (К) и загорских (З). Создание отводок, в каждой из которых сочеталась бы наследственность трех или четырех групп (З-НК, ЗУ-НК и др.) имело целью повысить генетическую гетерогенность исходного материала.

Первоначально в отводках среднерусского карпа было выявлено 3 основных аллеля трансферрина: *a*, *b*, *c*. У загорских карпов встречался и аллель *d*. У одного карпа ЗУ-НУ был найден *Tf<sup>e</sup>*. Во всех отводках преобладал аллель *Tf<sup>o</sup>*, вторым по частоте встречаемости был *Tf*. Особое место занимает созданная позднее группа Нем/У-НК<sup>D</sup>, отличавшаяся в первом поколении селекции высоким уровнем генетической изменчивости (6 аллелей *Tf* и 4 аллеля *Est-1*), что обусловлено ее происхождением, а именно, наличием наследственности немецких, украинских, нивских, курских и японских карпов.

Не во всех отводках среднерусского карпа были отмечены все 4 аллеля локуса *Est-1* (аллель *z* встречался только у загорских карпов и в группе Нем/У-НК<sup>D</sup>).

Парский карп. Порода парского карпа создана на базе рыбхоза "Пара" Рязанской обл. и состоит из двух отводок: М и УМ, первая из которых несет 50%, а вторая - 25% наследственности амурского сазана (Головинская, Боброва, 1982; Боброва, 1986). На ЦЭБ "Якоть"

парский карп впервые был завезен заводскими личинками в 1980 г. В 1989 г. была зарегистрирована порода "Парский карп", а в 2002 г. статус селекционного достижения получил созданный на основе отводки М тип "Московский чешуйчатый карп" (для I-II зон рыбоводства), в 2004 г. подана заявка на селекционное достижение "Московский разбросанный карп" (создан на основе группы УМ).

Парские (московские) карпы обладают наиболее высокой генетической изменчивостью по полиморфным локусам трансферрина (7)0, эстераз (*Est-1* и *Est-2*) и миогенов (*My-3*) среди трех изученных пород карпа селекции ВНИИПРХ. У парских карпов было выявлено 8 аллелей трансферрина (*a*, *a \ b*, *c*, *c \ d*,  $\xi$ ,  $\eta$ ), характер наследования которых подтвержден данными гибридологического анализа. Аллели *Tf<sup>e</sup>*, *Tf<sup>f</sup>*, *Tf<sup>g</sup>*, *Tf<sup>h</sup>* обнаружены не во всех исследованных генерациях, что обусловлено «эффектом основателя». У московских карпов отмечены все известные аллели локусов *Est-1*, *Est-2*, *My-3*.

Ангелинские карпы. В рыбхозе "Ангелинский" Краснодарского края под руководством В.С.Кирпичникова и Ю.И.Илясова (Кирпичников и др. 1987) селекционеры вели работу, направленную на повышение устойчивости карпа к краснухе. В 1999 г. были зарегистрированы породы "Ангелинский чешуйчатый карп" и "Ангелинский зеркальный карп". На первых этапах селекции ангелинских карпов локус *Tf* в отводках М (ангелинские зеркальные) и Р (ропшинские) был представлен аллелями *a*, *b*, *c*, *c* в отводке УР (ангелинские чешуйчатые) встречались также единичные особи, несущие аллель *Tf<sup>d</sup>*. В каждой из групп найдены все 4 аллеля локусов *Est-1*, *Est-2* и оба аллеля *My-3*. Вместе с тем, различия по распределению частот аллелей и особенно частот генотипов этих локусов были довольно значительны. У местных и ропшинских карпов преобладал медленный аллель сывороточных эстераз (*Est-1<sup>l</sup>*) и только у украинско-ропшинских -быстрый аллель(*Est-1<sup>f</sup>*).

Белорусские карпы. У белорусских карпов из рыбхозов "Лавва" и "Тремля присутствовало по семь аллелей: *a*, *b*, *c*, *c*, *d*, *z* и *u* и по 18 генотипов *Tf*. Это свидетельствует как о высокой степени генетической гетерогенности по этому локусу, так и о доле наследственности амурского сазана, что подтверждается и данными о происхождении

этих групп карпа (Таразевич, Илясов, 1992). В локусе *Est-1* часто встречаются аллели *a* и *b*, редко - аллель *c*. Результаты исследования локуса миогенов показывают повышенную частоту встречаемости *Му-3* *aa* у лахвинских карпов, несколько ниже она у тремлянских, что также говорит о присутствии наследственности амурского сазана.

Коллекция ЦЭБ ВНИИПРХ "Якоть". В разное время на центрально-экспериментальной базе ВНИИПРХ содержались и содержатся группы карпа и сазана, используемые в процессе селекции этой породы. Это немецкие карпы, амурский сазан, карпы-хромисты (гибриды с японскими карпами) и контрольная популяция (К<sub>0</sub>). Получены характеристики биохимического полиморфизма всех этих групп. Показано, что наибольшее число аллелей трансферрина встречается в группах азиатского происхождения (амурский сазан, гибриды с японскими карпами), наименьшее - у немецкого карпа, прошедшего длительную селекцию. Было выявлено засорение группы К<sub>0</sub>, что сделало невозможным ее использование в качестве контроля при селекции среднерусского карпа.

Общее количество аллелей *Tf*, выявленное нами в различных группах карпа, девять: *y, z, a, a b, c, c, d, e*. Аллели *Tfa c d, e, z* у встречались только у амурских сазанов или у карпов, несущих наследственность амурского сазана, что соответствует литературным данным.

Проведен гибридологический анализ наследования генотипа *Tf* AA ранее обозначавшегося как *TfW*. Показано, что он состоит из двух независимо наследуемых фракций с близкой подвижностью, идентификация которых облегчается при увеличении длины пробега. Носители аллеля *Tf\** имеют пониженную относительную приспособленность. В разные годы проведен гибридологический анализ характера наследования других аллелей трансферрина (*y, z, a, b, c, d*) и эстеразы-1 (*ab, c, z*) у карпа.

#### Глава 4. Генетическое маркирование групп карпа и сазана.

Данные о биохимическом полиморфизме среднерусского карпа были использованы для генетического маркирования отводок. В ка-

честве "генетических меток" были выбраны наиболее часто встречающиеся типы трансферринов. Уже при получении первого поколения селекции ( $F_1$ ) в 1974 г., отводка ЗУ-НУ была маркирована генотипом  $Tf AA$ , а отводка ЗУ-НК -  $Tf CC$ . В 1978 г. все производители З-НК, использованные для получения второго поколения селекции ( $F_2$ ), были подобраны по генотипу  $Tf AA$ . Между собой отводки с биохимическим маркером  $T/AA$  различаются типом чешуйного покрова: карпы ЗУ-НУ чешуйчатые, а З-НК - разбросанные. Карпы ЗУ-НК были представлены разбросанными карпами, а среди загорских в первых поколениях селекции встречались чешуйчатые, линейные, разбросанные и даже голые особи (сейчас - только чешуйчатые). В 1977 г. была предпринята попытка "насыщения" загорской отводки трансферрином  $d$ . С этой целью отбирали преимущественно производителей первого поколения, несущих аллель  $Tf^d$ , что привело к увеличению частоты встречаемости аллеля (с 0,262 в родительской группе до 0,351 у годовиков второго поколения селекции). У загорских производителей третьего поколения частота  $Tf^d$  достигла 0,484, что делало технически возможным полное маркирование этой отводки. Однако, целесообразность маркирования типом трансферрина, редко встречающимся в природных условиях, вызвала определенные сомнения и не была осуществлена. У производителей загорских карпов пятого поколения селекции частота встречаемости аллеля  $Tf^d$  не превышает 0,050.

Для того, чтобы исключить случайное "засорение" племенного материала, среднерусских карпов в каждом поколении селекции тестировали по биохимическим маркерам дважды: сеголетков (или годовиков) и производителей, отобранных для участия в воспроизводстве отводки. Единичные особи с несвойственными для этих отводок генотипами  $Tf$  были обнаружены среди производителей З-НК в 1984 г. и 1988 г., ЗУ-НК - в 1985 г., 1989 г., ЗУ-НУ - в 1976 г. и 1979 г. По результатам прижизненного тестирования таких производителей выбраковывали из маточного стада. В 1979 г. среди сеголетков ЗУ-НУ и в 1996 г. в группе ЗУ-НК было обнаружено сильное засорение, вызванное, очевидно, попаданием молоди из другого пруда. В связи с этим в 1980 г. было повторно осуществлено воспроизводство отвод-

ки ЗУ-НУ и выращенные сеголетки после проверки на чистоту были использованы для дальнейшей селекции.

Можно отметить, что использование генетического маркирования селекционных отводок среднерусского карпа позволило не только выявлять засорение племенного материала, но в ряде случаев, и определять его источник. Так, сочетание типа трансферрина СС с разбросанным типом чешуйного покрова у особи, обнаруженной среди карпов 3-НК, позволило предположить, что источник засорения - карп из отводки ЗУ-НК. В отводке ЗУ-НК в 1985 г. был обнаружен один самец с генотипом *TfAA* (скорее всего, 3-НК), и 1989 г. - самец с генотипом *TfAD* (в этот период такой генотип был характерен только для загорских карпов). В настоящее время аллель *Tfna*. ЦЭБ «Якоть» встречается только у парских (московских) карпов.

Создана генетически маркированная линия амурского сазана. Амурский сазан был завезен в Подмосковье в 1975 г. и прошел несколько поколений воспроизводства в местных условиях, без проведения отбора. К середине 90-х г. в группе сазана изредка стали появляться особи с иными вариантами чешуйного покрова, что свидетельствовало о попадании в стадо сазано-карповых гибридов. Для того, чтобы восстановить генетическую чистоту имеющегося племенного стада амурского сазана и обеспечить возможность ее надежного контроля в дальнейшем, в 1996-1997 гг. заложена генетически маркированная линия амурского сазана (АСМ), гомозиготная по двум маркерным системам: генам чешуйного покрова (доминантному аллелю *S* и рецессивному аллелю *n*) и рецессивному (нулевому) аллелю локуса миогенов *Mu-3<sup>r</sup>*, что свойственно амурскому сазану из естественных водоемов. Использование двойной генетической метки (*SSNN*, *Mu-3 aa*) дает возможность с высокой степенью надежности контролировать "чистоту" племенного материала, исключая его случайное засорение. Интересно, что в результате маркирования экстерьер рыб и частоты полиморфных аллелей изменились в сторону усиления черт, свойственных амурскому сазану

**Глава 5.** Изменение генетической структуры групп карпа в процессе селекции.

Изучение биохимического полиморфизма, проводимое на протяжении нескольких десятилетий, продемонстрировало снижение генетической гетерогенности в некоторых селекционных группах карпа (табл. 2).

У среднерусских карпов были исследованы все генерации с 1 по 4 поколений селекции, у парских (московских) и ангелинских карпов - по 1-3 генерации (из 2 - 6) в каждом из поколений селекции. Аллели  $Tf^a$ ,  $Tf^c$ ,  $Tf^y$ ,  $Tf^z$  были выявлены не во всех исследованных группах парского карпа. Поскольку частота их встречаемости в целом по стаду изначально очень невелика, очевидно, их носителей можно обнаружить не в каждой генерации. У парских (московских) чешуйчатых карпов в последних поколениях селекции не во всех генерациях выявлены "редкие" аллели  $Tf^y$  и  $Tf^a$ .

У московских разбросанных карпов не отмечено потери ни одного из существовавших аллелей изученных полиморфных локусов.

Не найдено свидетельств обеднения генофонда и в группах ангелинских карпов. Анализ изменения генетической гетерогенности среднерусских карпов затруднен тем, что ряд отводок маркирован типами трансферрина. Кроме того, исходная гетерогенность большинства отводок среднерусского карпа была ниже, чем у парских и ангелинских карпов. В то же время именно у среднерусских карпов отмечена утрата наибольшего числа известных с начала селекции аллелей (не менее одного аллеля с начальной частотой встречаемости более 0,005 в каждой группе).

К элементарным факторам микроэволюции, которые могут быть причиной снижения генетического разнообразия, следует отнести отбор (естественный или искусственный), генетический дрейф и миграции генов (Кайданов, 1996). Как случаи миграции генов можно воспринимать удаление части особей с нежелательными типами трансферрина при проведении генетического маркирования среднерусского карпа. Однако исчезновение аллелей других локусов (*Est-1*, *Est-2*) происходило не в момент маркирования групп типами трансферрина, а 1-2 поколения спустя.

Следовательно, нельзя признать миграцию генов причиной обеднения генофонда среднерусского карпа. Нами рассмотрены так-

же условия проведения отбора (чем жестче отбор, тем больше могут быть потери разнообразия в группе) и воспроизводства групп (чем меньше эффективная численность популяции, тем сильнее влияние генетического дрейфа и больше изменения частот аллелей, вплоть до их потери или фиксации).

Таблица 2 - Аллели полиморфных белковых локусов,  
встречавшиеся в различных селекционных группах карпа

Группа	Полиморфные локусы, аллели																	
	Tf						Est-1				Est-2			My-3				
	a	a'	b	c	c'	d	z	y	a	b	c	z	0	a	b	c	A	a
	<b>Парские карпы</b>																	
Москов. чеш.	п	г	«»	П	0	«»	«»	®	П	«»	«»	«»	«»	«»	П	«»	П	«»
Москов. разб.	П	0	«»	«»	«»	«»	«»	0	П	п	«»	«»	«»	«»	П	«»	П	«»
	<b>Среднерусские карпы</b>																	
З-НК	М	0	m	m	0	m	0	0	Ø	п	Ø	0	«»	«»	П	г	«»	П
ЗУ-НК	0	0	0	М	0	0	0	0	«»	П	Ø	0	«»	«»	П	«»	«»	П
ЗУ-НУ	М	0	0	m	m	0	0	0	п	П	Ø	0	п	«»	П	«»	П	«»
Загорские	п	0	Ø	П	0	«»	0	0	П	п	Ø	«»	п	«»	П	«»	П	«»
Нем/У-НК <sup>D</sup>	п	Ø	«»	П	0	Ø	®	Ø	«»	«»	R	«»	«»	«»	П	«»	«»	П
	<b>Ангелинские карпы</b>																	
Ангелин. зерк.	П	0	«»	«»	R	0	0	0	П	п	«»	R	«»	«»	П	«»	«»	П
Ангелин. чеш.	П	0	«»	«»	R	г	0	0	П	«»	R	0	«»	«»	П	«»	п	П
Ропшинские	П	0	«»	п	R	0	0	0	П	п	R	0	«»	«»	П	«»	«»	П

Примечание. Обозначения: «» - частота встречаемости данного аллеля изменяется в различных генерациях и поколениях селекции, но составляет более 0,005; Ø - аллель утрачен в процессе селекции; R "редкий" аллель; частота встречаемости менее 0,005; ® - аллель стал "редким" в процессе селекции; г - "редкий" аллель утрачен в процессе селекции; m - аллель утрачен в процессе маркирования; М - аллель является генетической меткой данной группы, 0 - аллель никогда не встречался в данной группе; П - аллель является преобладающим; п - аллель был преобладающим ранее.

Самый напряженный отбор (около 9%) применяли в селекции парских (московских) карпов, несколько ниже (13-16%) была напряженность отбора у ангелинских карпов, гораздо большую часть рыб (18-25%) сохраняли при селекции среднерусских карпов. Следовательно, не жесткость отбора в данном случае определяла уровень снижения генетического разнообразия.

Проявление генетического дрейфа усиливаются при малой эффективной численности популяции. Количество производителей, использованных для воспроизводства в каждом селекционном поколении, было наибольшим у парских карпов, коэффициент инбридинга (F) составил 5,18% за 9 поколений селекции у московских чешуйчатых карпов и 5,22% за 7 поколений у московских разбросанных. У ангелинских чешуйчатых и зеркальных карпов коэффициент инбридинга составлял, соответственно -11,53% и 12,65%. Наибольшие значения коэффициента инбридинга отмечены у среднерусских карпов - от 18,43 до 25,52% за 4 поколения селекции.

Таким образом, можно сделать вывод, что основной причиной снижения генетической гетерогенности селекционных групп явилось не проведение жесткого отбора, а малая эффективная численность популяций.

Анализ динамики частот генотипов у среднерусских карпов показывает тенденцию увеличения доли гетерозигот по локусам *Tf* (при отсутствии маркирования типом трансферрина) и *Est-I* у производителей каждого следующего селекционного поколения. В качестве примера приведены данные по загорскому карпу, поскольку в этой группе не проведено маркирование типом трансферрина (рис. 4) и у карпов ЗУ-ИГУ (рис.5).



Рис. 4. Доля гетерозигот по локусу *Tf* в селекционных поколениях загорского карпа.

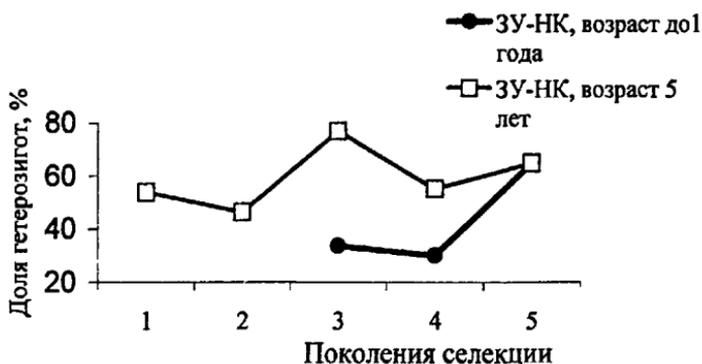


Рис. 5. Доля гетерозигот по локусу *Est-1* в селекционных поколениях карпов отводки ЗУ-НУ.

Обращает на себя внимание тот факт, что у рыб возрастом до года доля гетерозигот по локусам *Tf* и *Est-1* повышается в последующих поколениях селекции повышается, но никогда не превышает этот показатель у родителей (обычно ниже, чем у производителей родительского поколения, но выше, чем у сеголетков предыдущего поколения). Сравнение правомерно, поскольку изученные селекцион-

ные поколения среднерусского карпа были представлены одной генерацией, т. е. мы исследовали родительские группы и потомство.

В разных отводках (З, ЗУ-НУ, ЗУ-НК) наблюдалось и увеличение гетерозиготности по локусу *Est-1* от производителей первого поколения селекции к четвертому и пятому. Это связано, видимо, с проведением отбора по массе тела.

В отводке З-НК в связи с малым количеством производителей, использованных для воспроизводства в результате случайного подбора самцов и самок частота аллеля *Est-1<sup>b</sup>* у годовиков З-НК четвертого поколения достигла 0,970, а выросшие производители оказались уже полностью маркированы генотипом *Est-1* ВВ ("эффект основателя") (рис.6).



Рис. 6. Доля гетерозигот по локусу *Est-1* в селекционных поколениях карпов отводки З-НК.

Тенденцию к увеличению количества гетерозигот в онтогенезе (у двухлетков по сравнению с сеголетками) по локусам *Tf* и *Est-1* наблюдали в двух из трех исследованных генераций белорусского карпа (рис.7), по локусу *Tf* - у ангелинских зеркальных карпов старших возрастных групп по сравнению с младшими (рис.8).

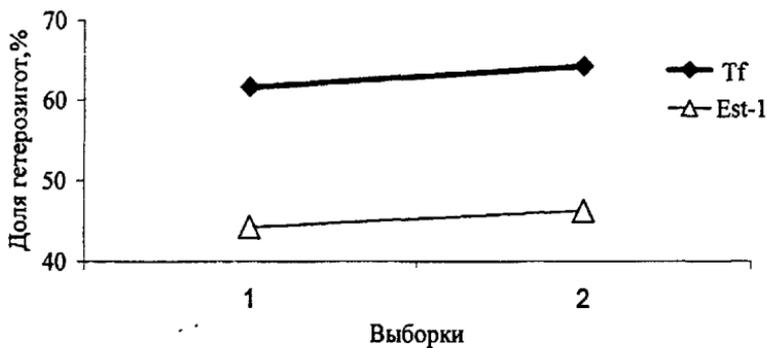


Рис 7. Изменение доли гетерозигот по локусам *Tf* и *Est-1* в генерации 1990 г. у тремлянских чешуйчатых карпов. Возраст особей в выборке 1 - сеголетки, в выборке 2 -двухлетки.

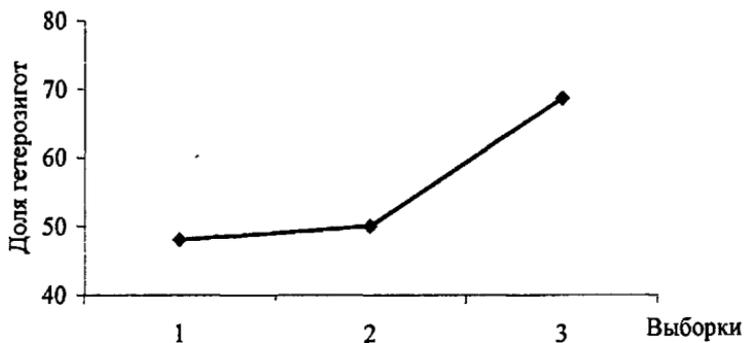


Рис 8. Изменение доли гетерозигот по локусу *Tf* в генерации 1990 г. ангелинского зеркального карпа. Возраст особей в выборке 1 - годовики, в выборке 2 -двухгодовики, 3- семигодовики.

К сожалению, проследить динамику гетерозигот у ангелинских и парских карпов удавалось редко, т.к. каждое поколение селекции этих пород было представлено несколькими генерациями и получен-

ные данные оказывались несопоставимыми, если исследованные рыбы представляли разные генерации.

Сходные явления наблюдаются при селекции пеляди (Локшина, Андрияшева, 1981). На основе изучения последствий массового отбора различной напряженности по массе тела даже разработан метод повышения гетерозиготности популяций сиговых рыб (Андрияшева, 1987). Снижение количества гетерозигот у сеголетков по сравнению с родительской группой, очевидно, является отражением того, что на начальных этапах онтогенеза идет отбор в пользу гомозигот.

Явление балансирующего отбора, когда на ранних стадиях жизненного цикла идет отбор против гетерозигот по ферментным локусам, а в более старшем возрасте - в пользу гетерозигот, описано у горбуши (Животовский и др., 1987). Увеличение среднего уровня гетерозиготности с возрастом обнаружено в популяциях фундулюса (Mitton, Koehn, 1975) и камбалы (Beardmore, Ward, 1978). Уменьшение генотипического разнообразия и увеличение гетерозиготности с возрастом в процессе развития и воспроизводства внутривидовых группировок диплоидных организмов охарактеризовано Л.А.Животовским и В.А.Духаревым (1985) как "сжатие" и "расширение" генетической изменчивости.

В процессе селекции значительно снизилось генотипическое разнообразие по локусу *Tf* во всех группах ангелинских карпов, преобладающим стал быстрый аллель *Est-1'*, частоты встречаемости генотипов и аллелей локусов *Tf* и *Est-1* во всех отводках значительно сблизились, различия между ними стали недостоверными. Все это позволяет сделать вывод о произошедшей консолидации групп по биохимическим маркерам под действием селекции на устойчивость к краснухе.

Глава 6. Исследование генетической гетерогенности потомств карпа, полученных с использованием дефростированной спермы.

Использование криоконсервации спермы как метода сохранения ценного генетического материала различных видов рыб, требовало решения вопроса о влиянии этого метода на генетическую структуру воспроизводимой популяции. Понижение оплодотворяющей способности спермы после криоконсервации свидетельствует о

происходящем отборе - ведь только часть изначально полученных спермиев участвует в образовании зигот. Хотя очевидно, что основным критерием отбора является криоустойчивость гамет (спермиев), однако нельзя исключить возможность того, что отобранные гаметы будут несколько отличаться от исходной совокупности и по другим качественным характеристикам.

Было проведено сравнение потомств карпа, полученных с применением криоконсервации спермы и без нее по частотам некоторых биохимических маркеров. Первое индивидуальное скрещивание было выполнено в 1993 г. Для получения разнокачественного потомства были отобраны производители разного происхождения: самка загорского карпа и цветной самец (гибрид с японскими карпами). Все полученные сеголетки имели светлый рисунок на голове и спине (ген D), что исключало возможность засорения.

Половину икры оплодотворяли нативной спермой, а вторую половину - спермой того же самца, но подвергнутой кратковременному замораживанию по стандартной методике (Цветкова и др., 2001). Выращивание опытных (полученных с применением дефростированной, т.е. подвергнутой кратковременному замораживанию, а затем размораживанию спермы) и контрольных потомств проводили отдельно в двух повторностях (4-х прудах).

По частотам генотипов и аллелей трансферрина различия между эмпирическими и теоретически ожидаемыми распределениями были достоверны и в опытной ( $p < 0,05$ ) и в контрольной ( $p < 0,01$ ) группах при объединении двух повторностей. Анализ распределения генотипов эстераз в потомствах первого индивидуального скрещивания показал недостоверность различий между эмпирическими и теоретически ожидаемыми данными в опытной и контрольной группах (в среднем по двум повторностям). Вместе с тем, эмпирические распределения частот генотипов *Est-1* в опыте и в контроле достоверно отличались друг от друга ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, анализ частот генотипов двух полиморфных локусов потомств первого индивидуального скрещивания показал:

- и в контрольном и в опытном потомстве обнаружены все возможные генотипы трансферрина (*Tf*) и эстеразы сыворотки крови (*Est-1*);

- имеются достоверные различия в распределении частот генотипов трансферринов и эстераз в контрольной и опытной группах.

Однако, отмеченные различия в распределении частот генотипов и аллелей двух полиморфных локусов могли быть как следствием применения дефростированной спермы, так и следствием выращивания контрольных и опытных рыб в разных прудах, хотя и в двух повторностях.

Для выяснения этого вопроса в 1994 году было поставлено второе скрещивание. В данном случае использовали производителей карпа, выращенных из икры, осмененной дефростированной спермой. Схема постановки опыта осталась прежней, однако, число проанализированных биохимических маркеров возросло до четырех за счет эстеразы мышц (*Est-2*) и миогенов (*My-3*). Пробы отбирали у годовиков карпа, что позволило последние полгода жизни содержать помеченных контрольных и опытных рыб в одном пруду.

Результаты биохимического тестирования годовиков опытного и контрольного потомств карпа по 4 полиморфным локусам представлены в таблице 3. Генотипы трансферрина у пары производителей, использованной во втором скрещивании - АВ и ВZ, сывороточных эстераз (*Est-1*) - АВ (у обеих особей), пробы мышц у производителей не брали.

Как видно из таблицы 3, все возможные в потомствах индивидуального скрещивания генотипы наблюдались как у опытных, так и у контрольных годовиков. В распределении генотипов и аллелей полиморфных локусов *Tf*, *Est-1*, *Est-2* и *My-3* достоверных различий между опытной и Контрольной группой не обнаружено.

В тоже время, "отличия в распределении генотипов *Est-2* и *My-3* от ожидаемого и в контроле, и опыте высоко достоверны ( $p < 0,001$ ) и однотипны, что свидетельствует об одинаковом направлении действия естественного отбора в опытной и контрольной группах.

При постановке индивидуальных скрещиваний подтвержден характер наследования аллелей  $Tf^z$ ,  $Est-1^z$   $Est-2^b$ ,  $Est-2^0$ . Выявлен дефицит гетерозигот по локусу  $Mu-3$ , что делает невозможным расчет частот аллелей на основании частоты встречаемости гомозиготы по нулевому аллелю и использования формулы Харди-Вайнберга.

Таблица 3. Частоты генотипов (%) и аллелей полиморфных белковых локусов в потомствах второго индивидуального скрещивания

Генотипы, аллели		Опыт	Контроль	Теоретически ожидаемое
<i>Локус Tf</i>				
Генотипы	BB	19,6	30,6	25,0
	AB	21,6	22,4	25,0
	AZ	21,6	24,5	25,0
	BZ	37,2	22,4	25,0
Аллели	$p^a$	0,216	0,235	0,250
	$q^b$	0,490	0,530	0,500
	$r^z$	0,294	0,235	0,250
<i>Локус Est-1</i>				
Генотипы	AA	34,7	36,3	25,0
	BB	29,7	25,5	25,0
	AB	35,6	38,2	50,0
Аллели	$p^a$	0,525	0,554	0,500
	$q^b$	0,475	0,446	0,500
<i>Локус Est-2</i>				
Генотипы	00	22,0	19,2	25,0
	BB	58,0	57,7	25,0
	B0	20,0	23,1	50,0
Аллели	$p^0$	0,320	0,308	0,500
	$q^b$	0,680	0,692	0,500
<i>Локус Mu-3</i>				
Генотипы	AA	56,8	46,2	25,0
	A0	21,6	28,8	50,0
	· 00	21,6	25,0	25,0
Аллели	$p^a$	0,676	0,606	0,500
	$q^0$	0,324	0,394	0,500

Таким образом, результаты анализа биохимических маркеров потомств второго индивидуального скрещивания продемонстрировали отсутствие достоверных различий между группами годовиков карпа, полученными с применением нативной и дефростированной спермы как по набору генотипов, так и по частотам встречаемости генотипов и аллелей четырех исследованных полиморфных локусов, что позволяет сделать вывод об отсутствии влияния криоконсервации на полноту воспроизведения генетического разнообразия у карпа.

Глава 7. Моно- и полиморфные системы в генетическом мониторинге стад белого и пестрого толстолобиков.

Рыбам дальневосточного комплекса и, в первую очередь, растительноядным, принадлежит важная роль в решении проблемы повышения продуктивности прудового, тепловодного и пастбищного рыбоводства. Использование белого и пестрого толстолобиков в качестве объектов поликультуры в нашей стране началось с конца 50-х годов 20 века (Виноградов, Ерохина, 1999). Контроль за поддержанием генетической гетерогенности маточных стад двух видов толстолобиков осуществить трудно в связи с низкими показателями генетической изменчивости, характерными для них ( $n=0,03$ ,  $\rho=0,07$ ).

Полиморфными локусами у белого толстолобика являются эстераза мышц, лактатдегидрогеназа печени и трансферрина (сыворотка крови). У пестрого толстолобика не найдено полиморфизма и по локусам эстеразы мышц и лактатдегидрогеназы печени. Изучение распределения фракций трансферрина в потомствах индивидуальных скрещиваний белого и пестрого толстолобиков не позволило раскрыть характер наследования этих белков. Как было показано М. Валентой с соавторами (Valenta et. al., 1977; Stratil et. al., 1983) у толстолобиков к молекуле трансферрина присоединяются остатки сиаловой кислоты.

Реальную угрозу созданию высокопродуктивных маточных стад белого и пестрого толстолобиков представляет в настоящее время засорение маточных стад гибридами между этими видами.

Выявление гибридов толстолобиков по морфологическим признакам (окраске тела, строению жаберного аппарата, длине киля и грудных плавников) требуют определенного навыка и позволяют

распознать, как правило, только гибридов первого поколения ( $F_1$ ). Возвратные (реципрокные) гибриды (FB) И гибриды второго ( $F_2$ ) и последующих поколений обычно сильно уклоняются в сторону одного из родительских видов и остаются неопознанными.

Решение этой проблемы требует таких методов контроля за чистотой маточных стад и ремонта обоих видов, которые позволяют прижизненно идентифицировать отдельных особей по их генотипу. В качестве генетических меток в подобных случаях применяют биохимические маркеры - мономорфные видоспецифичные белки. Исследования электрофоретических спектров ферментов и структурных белков белого и пестрого толстолобиков позволили рекомендовать в

Таблица 4. Результаты проверки стада растительоядных рыб из ОРХ "Селец" на чистоту происхождения по биохимическим маркерам и морфотипу

Вид	Возраст, лет, пол	n	Количество гибридов, выявленных по биохимическим маркерам, шт.							Доля гибридов, %
			1-му	2-м	3-м	4-м	5-ти	1+мор-фотип	2+мор-фотип	
ПТ	1	50	2	-	-	-	-	-	-	4,0
ПТ	3	50	11	1	3	2	9	-	-	52,0
ПТ*	3	50	7	-	-	1	-	-	-	16,0
ПТ	4	30	3	-	-	-	-	-	-	10,0
ПТ	5	26	2	-	-	-	-	-	-	7,7
ПТ	9	30	3	-	-	-	-	-	1	13,3
ПТ	♀♂	31	-	-	-	-	-	-	-	0,0
БТ	5	4	1	-	-	-	-	-	-	50,0
БТ	♀♂	20	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Гиб-риды	♀♂	2	-	-	-	-	-	2	-	100,0
Гиб-риды	♀♂	1	-	-	-	-	-	1	-	100,0

\*Примечание: пестрые толстолобики, завезенные из Одессы

качестве биохимических маркеров для идентификации гибридов между белым и пестрым толстолобиками преальбумины (*Pralb*), миогены (*My-IV* и *My-V*), супероксиддисмутазу (*Sod*) и щелочную фосфатазу (*Aph*) (Паюсова, Целикова, 1983; Паюсова и др., 1988). При этом гибриды первого поколения ( $F_1$ ) можно выявить в 100% случаев, а вероятность определения гибридов  $F_2$  и возвратных гибридов  $F_B$  была оценена как 50% (Паюсова, Целикова, 1983).

Проведенные в 1998 г. работы по генетической экспертизе племенных стад пестрого и белого толстолобиков из ОПХ "Селец" (таблица 4) позволили определить, что племенной материал засорен,

в основном, не гибридами первого поколения, а  $F_2$  и  $F_B$ . Кроме того, было продемонстрировано отсутствие сцепления между используемыми биохимическими маркерами, т.к. в изученных группах рыб отмечали особей, чье гибридное происхождение было выявлено по спектрам лишь одного из мономорфных локусов (*Pralb*, или *Sod*, или *My-V*, или *My-IV*). Это повышает вероятность выявления гибридов  $F_2$  в стадах исходных видов до 99%.

## Глава 8. Гетерогенность стад веслоноса в России.

Веслонос - единственный представитель отряда осетрообразных, питающийся планктоном. В настоящее время разработана технология искусственного разведения веслоноса и его выращивания в прудах в условиях Краснодарского края (Мельченков, Виноградов, 1991). Исследований биохимического полиморфизма веслоноса в нашей стране до 1990 года не проводилось. Работы иностранных авторов на эту тему немногочисленны. В наиболее информативной работе американских исследователей (Carlson et al., 1982) описано 15 белковых систем, кодируемых 35-ю локусами. Уровень генетической изменчивости у веслоноса оказался низким, большинство локусов (33 из 35 или 94%) мономорфны. Полиморфизм обнаружен лишь у креатинкиназы глаза (Ск-В) и фосфоглюкомутаза мышечной ткани (*Pgm-1*). Однако, судя по приведенным авторами частотам аллелей, локус *Pgm-1* тоже практически мономорфен. У всех исследованных особей веслоноса из пяти рек системы Миссисипи отмечен лишь медлен-

ный аллель локуса *Pgm-1* и только у рыб из реки Алабама был обнаружен ~~редкий аллель~~ аллель (с частотой 0,1 в одной единице).

Достаточно полно изучен американскими авторами субъединичный состав лактатдегидрогеназы (LDH) веслоноса. Так же, как и у американского осетра *Scaphirhynchus albus*, у веслоноса отмечено три субъединицы LDH - A4, B4 (активны в большинстве тканей) и C4 (наиболее активна в почках) (Horowitz, Whitt, 1972; Markert et al., 1975; Fisher et al., 1980).

Исследование других белковых систем показало, что аспартатаминотрансфераза, алкогольдегидрогеназа, глукосо-6-фосфатдегидрогеназа, глукософосфоизомераза, малатдегидрогеназа кодируются каждая двумя локусами, эстераза - четырьмя, а супероксиддисмутаза - одним. Все локусы мономорфны (Fisher et al., 1980; Carlson et al., 1982).

Следует отметить, что проанализировав 35 локусов из разных тканей (мышцы, печень, почки, сердце, глаза) авторы совершенно не исследовали сыворотку крови. Между тем, хорошо известно, что многие белковые системы сыворотки крови у осетровых рыб, такие как альбумины, трансферрины, преальбумины, эстеразы полиморфны (Алтухов, 1974; Кирпичников, 1979; Лукьяненко и др.; Кузьмин, 1996).

Поэтому основное внимание в нашей работе мы уделили изучению полиморфизма белков сыворотки крови. В 1990-96 гг. были собраны пробы крови разновозрастных особей веслоноса двух стад - из хозяйства "Горячий Ключ" и специализированного рыбозаводного завода растительной пищи (СРЗПП).

Как видно из таблицы 5, в выборках веслоноса из "Горячего Ключа" преобладающим аллелем является *Alb<sup>b</sup>*, значения частоты встречаемости каждого из трех аллелей эстеразы близки к 0,3, однако преобладает аллель *Est<sup>b</sup>* (таб.6). Стадо СРЗПП характеризовалось более высокой частотой встречаемости *Alb<sup>a</sup>* и невысокая частота аллеля *Est<sup>f</sup>* (0,187). Доля гетерозиготных генотипов по этому локусу составляла 66,7%, это показывает, что тенденции к гомозиготизации не наблюдалось. Интересно, что по обоим полиморфным локусам доля гетерозигот у производителей веслоноса в стаде СРЗПП была вы-

ше, чем у сеголетков (по локусу *Alb* - 50,0% у производителей и 43,8% у сеголетков; по локусу *Est* - соответственно 72,2% и 63,3%).

Таблица 5. Частоты генотипов (%) и аллелей альбумина у веслоноса из разных хозяйств России

Год сбора проб (возраст, лет)	Генотипы <i>Alb</i>						n	Частоты аллелей		
	AA	BB	CC	AB	BC	AC		a	b	c
<b>"Горячий Ключ"</b>										
1990 (1)	11,0	34,1	3,7	20,7	28,0	2,4	82	0,226	0,585	0,189
1993 (≤1)	5,4	27,0	13,5	5,4	32,4	16,2	37	0,162	0,459	0,378
Всего	9,2	31,9	6,7	16,0	29,4	6,7	119	0,206	0,546	0,248
<b>СРЗРР</b>										
1995, ♀♂	11,1	33,3	5,6	27,8	11,1	11,1	18	0,306	0,527	0,167
1995, 0+	28,1	25,0	3,1	28,1	6,3	9,4	32	0,468	0,422	0,110
Всего	22,0	28,0	4,0	28,0	8,0	10,0	50	0,410	0,460	0,130
1996	31,6	5,3	-	-	3,8	26,3	19	0,447	0,237	0,316
<b>НПЦ "Биос"</b>										
2000, ♀♂ (9)	0,0	45,4	0,0	18,2	0,0	36,3	11	0,273	0,545	0,182
2000(1)	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,800	0,200	0,0
Всего	25,0	37,5	0,0	12,5	0,0	25,0	16	0,437	0,437	0,125

Снижение количества гетерозигот у сеголетков веслоноса по сравнению с родительской группой, возможно, является проявлением балансирующего отбора.

Результаты изучения биохимического полиморфизма веслоноса свидетельствуют, что несмотря на единое происхождение стад "Горячего Ключа" и СРЗРР, генетический дрейф в этих группах привел к различиям в распределении частот генотипов и аллелей двух полиморфных локусов. Вместе с тем, генетическая гетерогенность поддерживалась на достаточно высоком уровне.

В 2000 г. мы получили небольшое количество (16 шт.) проб сывотки крови веслоноса из НПЦ "Биос". Маточное стадо в этом хозяйстве состоит из рыб, выращенных из личинок веслоноса, завезен-

ных из рыбхоза "Горячий Ключ". Несмотря на малое количество поступивших для анализа проб, у производителей веслоноса из НПЦ "Биос" отмечены все известные аллели альбумина и эстеразы сыворотки крови (табл. 5, 6), что делает возможным воспроизведение всего спектра генетической изменчивости по данным локусам.

Таблица 6. Частоты генотипов (%) и аллелей сывороточной эстеразы у веслоноса из разных хозяйств России.

Год сбора проб, (возраст, лет)	Генотипы <i>Est</i>						n	Частоты аллелей		
	AA	BB	CC	AB	BC	AC		a	b	c
<b>"Горячий Ключ"</b>										
1990 (1)	18,3	22,6	22,6	16,1	12,9	7,5	93	0,301	0,371	0,328
1993(≤1)	2,7	37,8	8,1	13,5	27,0	1,8	37	0,149	0,581	0,270
Всего	13,8	26,9	18,5	15,4	16,9	8,5	130	0,258	0,431	0,312
1996	0,0	10,0	50,0	0,0	35,0	5,0	20	0,025	0,275	0,700
<b>СРЗРР</b>										
1995, ♀♂	0,0	22,2	5,6	33,3	33,3	5,6	18	0,194	0,555	0,251
1995 (<1)	3,3	26,7	6,7	10,0	33,3	20,0	30	0,183	0,483	0,334
Всего	2,1	25,0	6,3	18,7	33,3	14,6	48	0,187	0,510	0,303
1996	0,0	26,3	26,3	10,5	26,3	10,5	19	0,105	0,447	0,447
<b>НПО "Биос"</b>										
2000, ♀♂ (9)	0,0	27,3	27,3	9,1	27,3	9,0	11	0,091	0,454	0,454
2000(1)	0,0	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	5	0,100	0,900	0,0
Всего	0,0	43,8	18,7	12,5	18,7	6,2	16	0,094	0,594	0,312

**Глава 9.** Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад сибирского осетра.

Современное состояние запасов осетровых России характеризуется катастрофическим положением, связанным с резким уменьшением их численности. В результате антропогенных нагрузок в последние десятилетия резко сократилась численность осетровых рыб в во-

доемах России. 8 из 11 обитающих в России видов осетровых рыб полностью или частично внесены в Красную книгу РФ. Основным, а иногда и единственным, источником формирования и поддержания запасов этих видов является заводское воспроизводство. Важность поддержания генетической гетерогенности формируемых популяций неоднократно подчеркивалась рядом авторов (Баранникова и др., 2000). В состоянии депрессии находятся многие стада сибирского осетра (Рубан, 1998).

Задача поддержания генетического разнообразия при воспроизводстве предполагает наличие хорошей базы данных по генетической изменчивости вида и осуществление мониторинга естественных популяций, маточных и коллекционных стад (Аллендорф, Риман и Аттер, 1991). Цель - свести к минимуму влияние инбредной депрессии от близкородственного скрещивания и обеспечить тем самым кратковременную программу выживания и сохранения численности.

Наряду с этим нужна долговременная программа поддержания генетического разнообразия, связанная с созданием многих искусственных популяций одного вида, где сохранялись бы различные сочетания редких аллелей полиморфных локусов.

Особенность генетики сибирского осетра заключается в том, что этот вид является октаплоидным (Васильев, 1985). В результате полиплоидизации хромосомы и находящиеся в них локусы у предковой формы были дублированы. Однако, в процессе последующей эволюции часть дублированных локусов подверглась вторичной диплоидизации. В результате в геноме сибирского осетра встречаются как дублированные, так и недублированные локусы.

Методами электрофореза в полиакриламидном и крахмальном геле исследовано 15 ферментных систем, из них пригодными для целей генетического мониторинга оказались шесть - фосфоглюкомутаза (PGM), фосфоглюкоизомеразы (GPI), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGDH), малатдегидрогеназа (MDH), изоцитратдегидрогеназа (ГОН), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (G3PDH), лактатдегидрогеназа (LDH).

Выявлены различия в распределении частот аллелей некоторых полиморфных локусов у сибирского осетра ленской, байкальской и

обской популяций (табл.7) из стада КЗТО (Конаковского завода товарного осетроводства).

Таблица 7. Частоты аллелей полиморфных локусов в заводских стадах сибирского осетра из разных популяций

Аллели полиморфных локусов	Осетр сибирский байкальский	Осетр сибирский ленский, генерации 1999 2003		Осетр сибирский обский
	<i>6-Pgd-1,2</i>			
1	0,523	0,417	0,481	0,318
2	0,347	0,524	0,250	0,470
3	0,130	0,059	0,269	0,212
Доля гетерозигот	0,589	0,548	0,519	0,575
	<i>Gpi-1</i>			
1	1,0	0,306	-	0,420
2	0,0	0,694	-	0,580
Доля гетерозигот	0,0	0,425	-	0,800
	<i>Gpi-2</i>			
3	1,0	0,741	-	-
4	0,0	0,259	-	-
Доля гетерозигот	0,0	0,384	-	-
	<i>Pgm-2,3 (1,2)</i>			
1	0,307	0,095	0,033	0,187
2	0,380	0,900	0,641	0,740
3	0,313	0,005	0,326	0,073
Доля гетерозигот	0,663	0,181	0,521	0,386
	<i>Mdh-1,2</i>			
1	0,015	0,186	0,269	-
2	0,985	0,814	0,730	-
Доля гетерозигот	0,663	0,181	0,462	-
	<i>Idh-2,3</i>			
1	-	-	-	0,337
2	-	-	-	0,663
Доля гетерозигот	-	-	-	0,430

Для работ по прижизненному генетическому мониторингу стад сибирского осетра рекомендованы четыре системы - лактатдегидрогеназа (LDH), малатдегидрогеназа (MDH), фосфоглюкомутаза (PGM) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGDH). Характер наследования этих локусов изучен в потомствах индивидуальных скрещиваний.

Глава 10. Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад стерляди.

Вопрос о сохранении генофонда стерляди становится жизненно важным для существования этого вида.

Стерлядь является тетраплоидом (Васильев, 1985). Для таких видов тоже имеются известные сложности в интерпретации электрофоретических картин. Отмечено, что более примитивные виды (например, осетровые) имеют тенденцию сохранять больше дублированных локусов, в то время как виды, более эволюционировавшие (карповые), обнаруживают диплоидизацию - потерю экспрессии многих дублированных генов. Предполагается, что она обусловлена фиксацией нулевых аллелей как структурных, так и регуляторных генов, то есть вместо продуктов четырех генов мы видим активные продукты двух генов. Отсутствие диплоидизации проявляется в виде существования так называемых изолюкусов, когда во всех четырех локусах могут быть сегрегированы одни и те же аллели.

Было изучено 15 ферментных систем стерляди: аспаратаминотрансфераза (ААТ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (G-3PDH), лактатдегидрогеназа (LDH), малатдегидрогеназа (MDH), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGDH), аконитаза (АСО), малик энзим (МЕ), алкогольдегидрогеназа (ADH), глюкозо-6-фосфатизомераза (GPI), изоцитратдегидрогеназа (IDH), супероксиддисмутаза (SOD), эстераза (EST), эстераза D (EST-D), фосфоглюкомутаза (PGM), фумаратдегидрогеназа (FH).

Полиморфными оказались 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, аконитаза, эстераза, фумараза, фосфоглюкомутаза, глюкозо-6-

фосфатизомераза, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа и малик энзим.

Для изучения характера наследования полиморфных систем было поставлено несколько вариантов индивидуальных скрещиваний стерляди. Активность некоторых из изученных систем оказалась очень слабой, характер наследования других расшифровать не удалось, некоторые были активны лишь в мышцах или печени. Нашей основной задачей было выявление генетического полиморфизма ферментов, активных в крови. Три системы, активные в эритроцитах (PGDH, GPI, MDH) могут быть рекомендованы для дальнейшей работы по прижизненному анализу генотипов.

Таблица 8. Частоты аллелей полиморфных локусов у волжской стерляди Конаковского завода

Локусы	<i>Pgdh-1,2</i>				<i>Pgm-4</i>		<i>Mdh-1,2</i>		<i>Ldh-4</i>		
	1	2	3	4	1	2	1	2	1	2	3
Частоты аллелей	0,356	0,173	0,375	0,096	0,250	0,750	0,943	0,057	0,802	0,155	0,043
Доля гетерозигот	0,635				0,227		0,227		0,310		

## **Выводы:**

1. Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследован биохимический полиморфизм локусов *Tf Est-1*, *Est-2* и *My-3* у разных племенных групп среднерусского, ангелинских и московских (парских) лахвинских, тремлянских, немецких карпов, амурского сазана и гибридов с японским карпом. Наибольшей генетической изменчивостью по изученным локусам обладает амурский сазан, наименьшей - немецкий карп.

2. Генетическое маркирование отводок среднерусского карпа генотипами *Tf* позволяет не только обнаруживать засорение селекционного материала, но в ряде случаев, и определять его источник.

3. Анализ набора аллелей полиморфных локусов *Tf Est-1* и *My-3* и их частот позволил выявить присутствие наследственности амурского сазана в отводках парского и краснодарского карпа, у белорусских карпов и в группе **К<sub>0</sub>**.

4. Анализ динамики частот генотипов *Est-1* в четырех отводках среднерусского карпа выявил повышение доли гетерозиготных особей в процессе селекции от первого поколения селекции к пятому. Аналогичное увеличение гетерозиготных по локусу *Tf* генотипов отмечено в селекционных поколениях загорских карпов, не маркированных типом *Tf*.

5. Отбор по признакам продуктивности у карпа приводит к увеличению в онтогенезе количества особей, гетерозиготных по трансферринам и сывороточным эстеразам. У производителей карпа отмечено повышение доли гетерозигот по локусам *Tf* и *Est-1* по сравнению с рыбами младших возрастных групп во всех отводках среднерусского и у московского чешуйчатого карпа. Аналогичная тенденция наблюдается при сравнении сеголетков и двухлетков лахвинских и тремлянских карпов, разновозрастных групп ангелинских карпов. По локусам *Est-2* и *My-3* подобных изменений не отмечено.

6. В различных генерациях ангелинских, московских и среднерусского карпов выявлено проявление "эффекта основателя". Уменьшение в процессе селекции генетического разнообразия групп зависит

от условий проведения отбора. Основной причиной снижения генетической гетерогенности селекционных групп явилось не проведение жесткого отбора, а малая эффективная численность популяций, то есть небольшое число производителей, используемых для воспроизводства и малое (1-2) количество генераций в каждом селекционном поколении.

7. Жесткий суммарный отбор по двум направлениям (на устойчивость к краснухе и по темпу роста) привел к консолидации неродственных по происхождению породных групп: ангелинских чешуйчатых (УР) и ангелинских зеркальных (М) карпов. Частоты генотипов и аллелей локусов *Tf* и *Est-1* у карпов, селекционируемых на устойчивость к краснухе (ангелинского чешуйчатого, ангелинского зеркального и ропшинского) в процессе селекции значительно сблизились.

8. Заложена генетически маркированная линия амурского сазана (АСМ), характеризующаяся гомозиготностью всех представителей по двум маркерным системам: генам чешуйного покрова (SSnn) и нулевому аллелю локуса миогенов (*My-3* aa). Использование двойной маркерной системы дает возможность с высокой степенью надежности контролировать "чистоту" племенного материала, исключая его случайное засорение. Генетическое маркирование племенного стада привело к сопряженным изменениям других генетических систем. Повысилась встречаемость аллелей *B* и *у* локуса трансферрина. Несколько изменился экстерьер рыб в сторону усиления черт, свойственных амурскому сазану.

9. Проведен гибридологический анализ характера наследования аллелей *сuz* локуса *Est-1* и аллелей *а, с, у* и *z* локуса *T/y* карпа, аллелей локусов ***Pgm-2,3; Pgdh-1,2; Gpi-1* и *Gpi-2; Ldh-4* и *MdhB-1,2* у сибирского осетра, локусов ***Pgm-4; Pgdh-1,2; Gpi-1,2* и *Mdh-3,4*** у стерляди. Карпы, гомо- и гетерозиготные по трансферрину *A'*, обладают пониженной относительной приспособленностью. Как при анализе распределения частот генотипов по локусу *My-3* в выборках из племенных стад карпа, так и при анализе потомств индивидуальных скрещиваний выявляется устойчивый дефицит гетерозигот по локусу *My-3*, что делает невозможным расчет частот аллелей на основании**

частоты встречаемости гомозиготы по нулевому аллелю и использования формулы Харди-Вайнберга.

10. Распределение генотипов 4-х полиморфных локусов - трансферринов, эстераз мышц, эстераз сыворотки крови и миогенов в потомствах карпа, полученных с применением нативной и дефростированной спермы, не отличаются друг от друга, что свидетельствует об отсутствии влияния процесса криоконсервации спермы на полноту воспроизведения генетической разнокачественности групп.

11. Использование спектров пяти мономорфных видоспецифичных белков и ферментов - преальбуминов, миогенов, супероксиддисмутазы и щелочной фосфатазы позволяет выявить всех гибридов белого и пестрого толстолобиков первого поколения и более 99% межвидовых гибридов второго поколения. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии сцепления между этими локусами.

12. Уровень засорения межвидовыми гибридами стад белого и пестрого толстолобиков ОПХ "Селец" (Республика Беларусь) составляет в целом по хозяйству 17,2 %, что примерно соответствует данным, полученным в различных рыбоводных хозяйствах бывшего СССР. Среди производителей белого и пестрого толстолобиков частота встречаемости гибридов составила всего 5,4 %, что позволяет избавиться от засорения, проведя мечение и прижизненное тестирование производителей.

13. В сыворотке крови веслоноса активны полиморфные локусы альбуминов (3 аллеля) и эстеразы (3 аллеля). Электрофоретический анализ белковых продуктов этих локусов позволяет вести генетический мониторинг изменений в генетической структуре стад веслоноса.

14. У сибирского осетра из 15 исследованных ферментных систем пригодными для целей генетического мониторинга оказалось шесть - фосфоглюкомутаза (PGM), фосфоглюкоизомераза (GPI), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGDH), малатдегидрогеназа (MDH), изоцитратдегидрогеназа (ГОН), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (G3PDH), аконитаза (АСО). Для дальнейшей работы по прижизнен-

ному анализу генотипов у сибирского осетра могут быть рекомендованы PGDH, PGM, GPI, MDH.

15. У волжской стерляди выявлен полиморфизм восьми полиморфных ферментных систем из 15 исследованных: эстеразы (EST), фумаратдегидрогеназы (FH), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (G3PDH), глюкозо-6-фосфатизомеразы (GPI), лактатдегидрогеназы (LDH), малат-дегидрогеназы (MDH), малик энзима (ME), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (PGDH). Три системы, активные в эритроцитах (PGDH, GPI, MDH), могут быть рекомендованы для дальнейшей работы по прижизненному анализу генотипов.

#### Основные работы по теме диссертации:

1. Щеглова Н.В., Илясов Ю.И. К вопросу об эстеразах у карпа. // В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб". - Л., 1979. - С.176-180.

2. Катасонов В.Я., Боброва Ю.П., Стояновский И.И., Щеглова Н.В. Состояние работ по селекции среднерусского карпа. // Сб. науч. тр. /Генетика и селекция рыб - М.: ВНИИПРХ, 1980. - Вып.28. - С. 3-24.

3. Катасонов В.Я., Ильина И.Д., Демкина Н.В., Трувеллер К.А. Использование биохимических маркеров в селекции среднерусского карпа.// Сб. науч. тр. / Генетические исследования, селекция и племенное дело в рыбоводстве - М.: ВНИПРХ, 1986. - Вып.48. - С. 14-23.

4. Демкина Н.В., Демкин А.П. Возможность использования биохимических маркеров при двухлинейном разведении карпа в рыбсовхозе "Ставропольский".// Сб. науч. тр. / Генетические исследования, селекция и племенное дело в рыбоводстве. - М.: ВНИПРХ, 1986. -Вып.48. - С. 130-133.

5. Демкина Н.В. Биохимический полиморфизм отводки "М" парского карпа, выращенной в условиях ЦЭБ "Якоть". // Сб. науч. тр. /

Вопросы селекции, генетики и племенного дела в рыбоводстве. - М.:ВНИПРХ, 1989.-Вып.58. - С. 12-16.

6. Демкина Н.В., Катасонов В.Я., Ильина И.Д., Трувеллер К.А. Увеличение гетерозиготности по локусам эстеразы и трансферрина в селекционных поколениях среднерусского карпа. // Мат-лы VI съезда ВОГИС (Минск, 23-27 ноября 1992 г.). - М., 1992. - С. 51.

7. Демкина Н.В., Катасонов В.Я. Увеличение гетерозиготности в селекционных поколениях среднерусского карпа по локусам сывороточной эстеразы и трансферрина. // Сб. науч. тр. / Вопросы генетического и экологического мониторинга объектов рыбоводства. - М.: ВНИПРХ, 1992. - Вып. 68. - С. 23-29.

8. Демкина Н.В., Таразевич Е.В. Биохимический полиморфизм трансферринов и сывороточных эстераз лахвинского и тремлянского карпов. // Сб. науч. тр. / Вопросы генетического и экологического мониторинга объектов рыбоводства. - М.: ВНИПРХ, 1992. - Вып. 68. - С. 48-55.

9. Демкина Н.В. Биохимический полиморфизм различных породных групп карпа. / Автореферат канд. диссерт. - М.: ВНИИПРХ, 1993.-23 с.

10. Паюсова А.Н., Безруков В.Ф., Целикова Т.Н., Зюзин А.А., Демкина Н.В. Использование биохимических маркеров в генетических исследованиях и селекции растительных рыб (Рекомендации)// - М.: ВНИИПРХ, 1993. - 34 с.

11. Dyomkina N.V., Tsvetkova L.I. Investigations of the genetical heterogeneity of carp generations reived by using of cryoconservated sperm.// 3rd Ichthyochaematological Conference, Lytomysl, Czeech Republic, November 30 - December 2. - Lytomysl, 1993. - P. 14.

12. Демкина Н.В., Цветкова Л.И., Шарт Л.А. Генетическая гетерогенность потомств карпа, полученных с применением криоконсервированной спермы.// Рыбное хоз-во, сер. Аквакультура: Информ. пакет "Совр. аквакультура". - Вып 1. - М.: ВНИЭРХ, 1997. - С.79-80.

13. Демкина Н.В., Илясов Ю.И. Сертификация племенного материала у рыб: возможности и задачи. // Мат-лы межд. совещ. "Проблемы развития рыбн. Хоз-ва на внутр. водоемах в условиях перехода

на рыночн. отношения" (Минск , 1998). / Белорусское издат. товарищество "Харта", 1999. С. 60-64.

14. Демкина Н.В. Снижение генетической изменчивости в селекционных поколениях карпа. // Мат-лы докл. 2 межд. симп. "Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре (Адлер, октябрь 1999). - Краснодар, 1999.-С. 33-34.

15. Мельченков Е.А., Демкина Н.В. Гетерогенность маточных стад веслоноса // Рыбоводство и рыболовство. - 2001, № 1. - С. 77-78.

16. Багров А.М., Боброва Ю.П., Катасонов В.Я., Илясов Ю.И., Демкина Н.В. Рыбоводно-биологические особенности породы карпа "Парская" // Докл. Рос. академии с/х наук. - 2001. - № 2, март-апрель. - С. 42-45.

17. Боброва Ю.П., Катасонов В.Я., Демкина Н.В. Зональный тип породы парского карпа: московский чешуйчатый. // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. - Вып. 76.- М.:ВНИРО, 2001 - С.36-47.

18. Катасонов В.Я., Поддубная А.В., Дементьев В.Н., Демкина Н.В. Основные итоги селекции среднерусского карпа // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. - Вып. 76. - М.:ВНИРО, 2001. - С. 47-59.

19. Катасонов В.Я., Поддубная А.В., Демкина Н.В. Формирование и рыбоводно-биологическая характеристика генетически маркированной линии амурского сазана (АСМ) // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. - Вып. 76. - М.:ВНИРО, 2001. - С. 59-69.

20. Демкина Н.В. Сравнение различных по происхождению групп карпа по индексам генетического сходства, рассчитанным по частотам фенотипов и аллелей трансферрина и эстеразы // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. - Вып. 76. - М.:ВНИРО, 2001. -С. 69-74.

21. Рябова Г.Д., Политов Д.В., Офицеров М.В., Малюченко О.П., Демкина Н.В., Шарт Л.А., Илясов Ю.И. Прижизненный анализ полиморфных белковых систем стерляди // Сб. научн. тр.

ВНИИПРХ^ Вопросы генетики, селекции и племенного дела в рыбоводстве. - Вып. 76. - М.:ВНИРО. 2001. - С. 95-107.

22. Рябова Г.Д., Политов Д.В., Офицеров М.В., Климонов В.О., Демкина Н.В., Шарт Л.А., Баранова Н.А. Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад сибирского осетра.(Методические указания) // Сб. нормативно-технологической документации по аквакультуре. - М.: ВНИРО, 2001. -С.-106-118.

23. Рябова Г.Д., Политов Д.В., Офицеров М.В., Демкина Н.В., Шарт Л.А. Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад стерляди. (Методические указания) // Сб. нормативно-технологической документации по аквакультуре. - М.: ВНИРО, 2001.-С. 117-132.

24. Демкина Н.В., Шарт Л.А., Баранова Н.А. Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад карпа. (Методические указания) // Сб. нормативно-технологической документации по аквакультуре.- М.: ВНИРО, 2001. - С. 133-149.

25. Боброва Ю.П., Катасонов В.Я., Демкина Н.В., Лаврухина СИ. Московский чешуйчатый карп. Авторское свид-во № 32383 от 18.02.2002.

26. Демкина Н.В. Использование биохимических маркеров в селекции и разведении объектов пресноводной аквакультуры. // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития. / Мат-лы междунар. научно-практич. конференции. М.: ВНИРО. 2002. С.154-158.

27. Рябова Г.Д., Демкина Н.В., Баранова Н.А., Илясов Ю.И. Исследование генетического полиморфизма сибирского обского осетра. // Актуальные вопросы пресн. Аквакультуры. Сб. научн. трудов. М.: ВНИРО. 2002. С. 117-120.

28. Демкина Н.В. Генетическое маркирование при селекции среднерусского карпа. // Зоотехния. - 2004. - № 6. - С. 12-13.

29. Багров А.М., Боброва Ю.П., Катасонов В.Я., Илясов Ю.И., Демкина Н.В. Рыбоводно-биологические показатели московского раз-

бросанного типа парской породы карпа. // Докл. Рос. академии с/х наук.- 2004.-№4.-С.56-58.

30. Демкина Н.В. Снижение генетического разнообразия племенных групп карпа в процессе селекции.. // Вестник РАСХН. - 2004. -№.-0.70-72.

31. Демкина Н.В. Биохимические маркеры в селекции и разведении объектов пресноводной аквакультуры: опыт ВНИИПРХ. // Рыбное хоз-во. 2004. -№ 6. -С. 47-48.

Отпечатано в полиграфическом агентстве «Литера»

Оперативная полиграфия Москва, ул Зорге, д.20 Т/ф 198-70-53

Заказ № 356 Сдано в печать 7 02 2005 г Тираж 140 экз Гарнитура "Times" Объем 2 пл



312

506

22 MAR 2008

