

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ВОДОЕМОВ на процесс генетико-биохимической **АДАПТАЦИИ КОСТИСТЫХ РЫБ**

Работа посвящена изучению изменчивости частот аллелей лактатдегидрогеназы (LDH, К.Ф. 1.1.1.27) черноморско-каспийской тюльки (кильки) *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Clupeiformes, Clupeidae) различных популяций нативного и новоприобретенного частей ареала. Выдвинуто предположение о связи частоты встречаемости аллеля *Ldh-A'120* с минерализацией среды обитания конкретной популяции. На основании особенностей распределения частот аллелей мышечной лактатдегидрогеназы-А вариант *Ldh-A'120* предложено определить как «волжский» аллель, а наблюдаемую высокую частоту аллеля *Ldh-A'120* в популяциях Верхней Волги можно объяснить как следствие их происхождения от жилой пресноводной формы.



Введение

Тип стратегии физиолого-биохимической адаптации, возможный при освоении иных местообитаний, существенно зависит от времени, которым располагает организм для адаптивной реакции, а скорость адаптации к какому-либо изменению среды будет зависеть от места осуществления этой адаптации в иерархии механизмов метаболической регуляции. Модуляция активности ферментов, уже функционирующих в клетке, иногда создает возможность почти мгновенной адаптации. В отличие от этого для активации и репрессии генов требуется длительное время; а для накопления в геноме новых последовательностей оснований ДНК, кодирующих адаптивные генные продукты, могут потребоваться десятки поколений [1]. В любом случае биохимическая адаптация направлена на компенсацию внешнего воздействия путем координированного изменения концентраций и типов синтезируемых продуктов, преимущественно макромолекул,

Д.П. Карабанов*,
научный сотрудник,
Институт биологии
внутренних вод
им. И.Д. Папанина
Российской
академии наук
(ИБВВ РАН)

главным образом белков [2]. В настоящее время объектом для изучения механизмов генетико-биохимических адаптаций в природных условиях могут служить активно саморасселяющиеся виды. Особый интерес среди вселенцев представляют рыбы, так как расширение их ареала часто связано со значительным изменением многих химических (соленость, pH) и физических (освещенность, температура) факторов. Среди рыб значительную скорость расширения ареала демонстрирует черноморско-каспийская тюлька *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840), которая за короткий промежуток времени (около 60 лет) освоила волжские водохранилища и адаптировалась к условиям северных пресных вод. Исходя из этого, задачей исследования является изучение изменчивости частот аллелей лактатдегидрогеназы (ЛДГ, К.Ф. 1.1.1.27) белых скелетных мышц черноморско-каспийской тюльки

* Адрес для корреспонденции: dk@ibiv.yaroslavl.ru

Clupeonella cultriventris (Nordmann, 1840) (Clupeiformes, Clupeidae).

За период 2002–2007 гг. было обработано 1146 проб тюльки возрастом от одного до трех лет из 16 точек ареала (табл. 1).

Изучение изменчивости частот аллелей ЛДГ проводилось с применением диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием концентрирующего 4 % ПААГ, разделяющего 7 % ПААГ на ТРИС-ЭДТА-боратном буфере с pH 7,2 при направлении электрофореза от катода к аноду (disc-PAGE, 4/7, ТЕВ, pH 7,2) по стандартным методикам [3, 4]. Подсчет и выделение полиморфных локусов проводился согласно методике [5]. Минерализация воды опреде-

Таблица 1

Частоты аллеля *Ldh-A'120* локуса мышечной лактатдегидрогеназы тюльки исследованных популяций

№	Водоем	Размер выборки	Частота аллеля <i>Ldh-A'120</i>	Общая минерализация, мг/л
1	р. Волга, Шекснинское в/х	27	0,789	400
2	р. Волга, Рыбинское в/х	360	0,724	380
3	р. Волга, Ивановское в/х	60	0,713	325
4	р. Волга, Горьковское в/х	65	0,755	320
5	р. Волга, Чебоксарское в/х	60	0,794	425
6	р. Волга, Куйбышевское в/х	39	0,766	425
7	р. Волга, Саратовское в/х	60	0,18	430
8	р. Волга, Волгоградское в/х	50	0,823	480
9	Сев. Каспий, устье р. Сулак	120	0,190	1280
10	Дельта р. Дон	40	0,273	870
11	Азовское море, Таганрогский залив	80	0,251	1200
12	р. Маныч, Пролетарское в/х	40	0,526	650
13	Канал Азовской водораспределительной системы	25	0,425	480
14	р. Днепр, Днепропетровское в/х	40	0,690	590
15	р. Днепр, Карачуновское в/х	40	0,460	680
16	Днестровский лиман	40	0,272	1100

лялась портативным кондуктометром с автоматической термокомпенсацией Hanna HI-9835, фактор пересчета проводимости в TDS равен 0,5. Анализ активности изоферментов проводили по электрофоретическим трекам с использованием пакета RFLPscan Plus v.3.12 (CSP Inc.), популяционно-генетические характеристики – при помощи программы BioSys r.2 (University of Illinois). В каждой серии экспериментов проводился индивидуальный анализ с последующей статистической обработкой результатов. Коэффициенты корреляции по Спирмену и Кендаллю получены с использованием пакета STATISTICA for Windows v.6 (StatSoft, Inc.).

Изоферменты мышечной лактатдегидрогеназы – одни из наиболее изученных ферментов у животных. Эти изоферменты контролируют метаболизм лактата и пирувата в гликолизе. У высших позвоночных лактатдегидрогеназа имеет четвертичную структуру и является тетрамером, состоящим из двух типов субъединиц А и В (ранее обозначавшиеся как М и Н). У большинства костистых рыб имеются три локуса – А и В (гомологичные соответствующим локусам млекопитающих), а также тканеспецифичный ген С, характерный только для рыб [2]. Тетрамер лактатдегидрогеназы белых скелетных мышц тюльки кодируется двумя генетическими локусами LDH-A и LDH-B. Локус LDH-A полиморфен, представлен двумя аллельными вариантами *Ldh-A100* (медленный вариант) и *Ldh-A'120* (быстрый вариант). Локус LDH-B у черноморско-каспийской тюльки мономорфен. Для популяционно-генетического анализа использовались аллели LDH-A. Частоты распределения аллелей *Ldh-A'120* в водоемах с различной минерализацией представлены в табл. 1. Наибольшая частота этого аллеля имеется в водохранилищах Верхней Волги, наименьшая – в морских популяциях.

Известно, что для географически и исторически связанных популяций должны обнаруживаться эффекты изоляции расстоянием [6]. Такой анализ был проведен в работе [7], где было показано как наличие связи между генетическим и географическим расстоянием, так и её отсутствие. Аналогичная работа была проведена для популяций тюльки Волжских водохранилищ. Генетические дистанции были получены из попарного сравнения межпопуляционных величин F_{ST} инбридинговых коэффициентов Райта ($G = f F_{ST}$). Данное сравнение для популяций тюльки более корректно, чем использование параметров межпопуляционных эффективных численностей популяций,

выраженных с учётом процента миграции (N_{em}) в связи со сложностью прямого определения этого показателя. Результаты, рассчитанные для 8 популяций черноморско-каспийской тюльки Волжского каскада водохранилищ на основании 12 полиморфных локусов, показывают отсутствие достоверной связи между географическим и генетическим расстояниями – коэффициент Кэндалля $r^2=0,023$; $p>0,13$. Эти данные могут свидетельствовать о существенной селективной составляющей в пространственной изменчивости ряда аллозимных локусов в популяциях исследованного вида [5].

Гетерогенность частот аллелей по локусу LDH-A среди изученных популяций крайне высока и не может быть объяснена воздействием случайных факторов. Регрессионный анализ показал сильную зависимость частоты аллеля *Ldh-A100* от общей минерализации водоема (рис. 1).

Коэффициент регрессии по Спирмену $r=0,87$ в доверительном интервале при $p<0,05$. Относительно других факторов окружающей среды (растворенный кислород, pH, средняя температура водоема) достоверной зависимости их влияния на распределение частот аллелей этого генетического локуса не установлено.

Вероятно, наблюдаемая особенность распределения частоты *Ldh-A100* связана с историческим «морским» происхождением этого аллеля. На популяционном уровне такая гипотеза подтверждается особенностями географического распределения аллелей

Ключевые слова:
Clupeonella
cultriventris,
 лактатдегидрогеназа,
 аллель,
 минерализация
 водоема

локуса LDH-A. В популяциях, обитающих при высокой минерализации воды, частота аллозима *Ldh-A100* максимальна, а у родственного, облигатно морского вида *C. engrauliformes* изофермент представлен только продуктом аналогичного аллеля [8]. В популяциях атлантической и тихоокеанской сельдей *Clupea harengus* и *C. pallasii* также преобладает аналогичный аллозим лактатдегидрогеназы [9]. Приняв это предположение, можно объяснить довольно высокие частоты аллельного варианта *Ldh-A100* в днепровских популяциях как следствие их филогенетической молодости, когда частоты «морского» аллеля ещё не приведены к «пресноводному» значению. Также не исключено, что на генный баланс популяций водохранилищ Нижнего Днепра существенное влияние оказывает регулярный обмен мигрантами с черноморскими лиманами.

Наблюдаемую высокую частоту аллеля *Ldh-A'120* в популяциях Средней и Верхней Волги можно объяснить как следствие их происхождения от популяций, длительное время обитавших в пресных водах волжских затонов. Реликтовые популяции тюльки в затомах в районе современного г. Саратов, вероятно, сохранились со времён Хвалынской трансгрессии и последующего отступления Каспия 20-40 тыс. лет назад. За этот период произошли значительные адаптационные изменения к обитанию в условиях пресных вод речных экосистем, что отразилось в существенном перераспределении аллельных частот LDH-A, а сам аллельный вариант *Ldh-A'120* можно определить как «волжский» маркер. В Днестре таких процессов не было, а продвижение тюльки по реке затрудняли Днепровские пороги. После начала гидростроительства на Днестре в XX веке гидрологический режим реки сильно изменился – пороги исчезли и возникли водохранилища. В результате этого произошло расселение тюльки из солоноватоводных лиманов в Днестр. Так как эволюционный возраст этих популяций мал и такого срока, вероятно, недостаточно для существенного изменения генетических показателей, то и наблюдаемая дивергенция между популяциями тюльки лиманов и Днестра невелика и не достигает таких значений, как для Волги и Каспийского моря.

Примером аналогичной пространственной генетической дифференциации, связанной с расселением из рефугиумов, служит послеледниковое распространение лососей. Следы этого процесса маркируются генетическими особенностями популяций как на уровне аллозимов [10, 11], так и на уровне ДНК-маркеров [12].

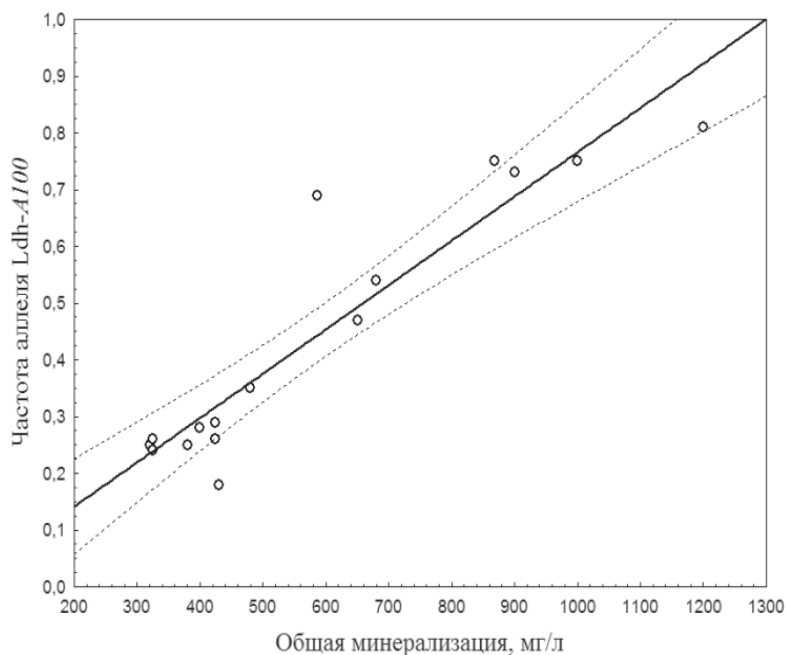


Рис. 1. Зависимость частоты аллеля *Ldh-A100* от общей минерализации исследованных водоёмов. Пунктиром отмечена зона доверительного интервала при уровне значимости $p<0,05$.

Заключение

Таким образом, наблюдаемое распределение аллелей ряда генетических локусов тюльки, не соответствующее теоретически ожидаемому, можно объяснить непосредственным влиянием окружающей среды, а именно минерализацией водоёма.

Автор выражает благодарность всем сотрудникам лаб. Эволюционной экологии ИБВВ РАН, в особенности зав.лаб. к.б.н. Ю.В. Слынько и к.б.н. В.И. Кияшко, а также д.б.н. Ю.Ю. Дгебуадзе и к.б.н. А.А. Махрову (ИПЭЭ РАН) за постоянную поддержку и консультации на всех этапах работы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00753-а и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых МК-1793.2011.4.

Литература.

1. Хочачка П. Стратегия биохимической адаптации: Пер. с англ. / П. Хочачка, Дж. Сомеро // М.: Мир, 1977. 398 с.
2. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. 520 с.
3. Walker J.M. Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of proteins / The Protein Protocols Handbook. 2nd ed. // Walker J.M., ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2002. P. 57-60.
4. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 2003. P. 1-553.
5. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431 с.
6. Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations // Evolution. 1993. V.47. P. 264-279.
7. Алтухов Ю.П. Популяционная генетика лососевых рыб / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова, В.Т. Омельченко // М.: Наука, 1997. 288 с.
8. Карабанов Д.П. Генетико-биохимические адаптации черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) при расширении ареала. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М, 2009. 24 с.
9. Jorstad K.E. Evidence for two highly differentiated herring groups at Goose Bank in the Barents Sea and the genetic relationship to Pacific herring, *Clupea pallasii* // Envir. Biol. of Fishes. 2004. V. 69. P. 211-221.
10. Hamilton K.A. Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: LDH-5 as a phylogeographic marker locus / K.A.Hamilton, A.Ferguson, J.B.Taggart, T.Tomasson, A.Walker, E.Fahy // J. Fish Biol. 1989. V. 35. P. 651-664.
11. Makhrov A.A. Alleles of sAAT-1,2* isoloci in brown trout: potential diagnostic marker for tracking routes of post-glacial colonization in northern Europe / A.A.Makhrov, O.Skaala, Yu.P.Altukhov // J. Fish Biol. 2002. V. 61. P. 842-846.
12. Makhrov A.A. Atlantic salmon colonization of the Russian Arctic coast: pioneers from North America / A.A.Makhrov, E.Verspoor, V.S.Artamonova, M.O'Sullivan // J. Fish Biol. 2005. V. 67. P. 68-79.



D.P. Karabanov

WATER SALINITY IMPACT ON BIOCHEMICAL ADAPTATION OF BONY FISH

The research of alleles' frequencies variability of the lactate dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) of sardelle *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (*Clupeiformes*, *Clupeidae*) populations in the native and in native parts of area has been provided. The correlation between the allele's Ldh-A'120 frequency

and mineralization level in the local population's habitat has been offered. On the base of allele's frequencies distribution peculiarities of muscular lactate dehydrogenase-A has been proposed to define the variant Ldh-A'120 as a "Volga"-allele. The observed allele's Ldh-A'120 high frequency in the sardelle's

populations of the Upper Volga has been explained as a result of its origin from the freshwater-living form.

Key words: *Clupeonella cultriventris*, lactate dehydrogenase, allele, water salinity.