

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ГЕНОМА НА ПОЛИМОРФИЗМ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭСТЕРАЗ И RAPD-МАРКЕРОВ У ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* И ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS*

В. В. Столбунова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: vvsto@mail.ru

Поступила в редакцию 30.04.2025

Размер генома леща *Abramis brama* больше, чем у плотвы *Rutilus rutilus* в 1.3 раза, что указывает на больший объем и разнообразие некодирующей ДНК доступной для отбора, которая может быть источником скрытой генетической изменчивости, способствующей лучшей коадаптации разнородных геномов при отдаленной гибридизации между данными видами. Эволюционное значение размера генома остается неясным. Анализ полиморфизма случайных мультилокусных (RAPD) маркеров и неспецифических эстераз проведен у *A. brama* и *R. rutilus* для выявления связи с размером генома. Данные маркеры охватывают кодирующую и некодирующую области ДНК, позволяя анализировать геном в целом. Общее число выявленных локусов по двум RAPD-праймам в индивидуальных спектрах плотвы и леща составило 89, из них 10 были общими, а 18 (у плотвы) и 33 (у леща) были видоспецифическими мономорфными. Обе выборки высокополиморфны, достоверно различались, выборка леща была более гомогенна. Спектры неспецифических эстераз печени, скелетной/сердечной мышц плотвы и леща были гетерогенны с совпадением электрофоретической подвижности зон. Зона *Est-2* основная с отсутствием тканеспецифичности у обоих видов является продуктом самостоятельного локуса и представлена тремя аллельными вариантами у плотвы (выявлено шесть генотипов) и одним компонентом с высокой активностью у леща. Полиморфизм данной зоны у леща проявляется разделением ее на два компонента с низкой частотой встречаемости генотипа (0.06), что может быть следствием мутации, не имеющей адаптивного значения. Зона *Est-1* леща тканеспецифична, в печени присутствует один компонент с высокой активностью, в сердце — три с преимуществом гомозигот, в сыворотке — два фрагмента со слабой активностью и не у всех особей. У плотвы зона *Est-1* печени представлена двумя фракциями с высокой активностью, в сердце выявлено три компонента, а зона *Est-3* имеет четыре аллельных варианта (девять генотипов). Таким образом, при увеличении размера генома леща по сравнению с плотвой показано снижение аллельного разнообразия локусов эстераз и большее сходство особей между собой, что может указывать на низкую вариабельность структурных генов, кодирующих данный белок, и различие регуляторных систем родительских геномов.

Ключевые слова: рыбы, Leuciscidae, Cyprinidae, плотва, лещ, неспецифические эстеразы, RAPD, полиморфизм, размер генома.

DOI: 10.47021/0320-3557-2025-86-100

ВВЕДЕНИЕ

В европейских водоемах широко распространена гибридизация плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) и леща *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii: Cyprinidae / Leuciscidae) [Economidis, Wheeler, 1989]. Молекулярные филогенетические данные показывают, что плотва и лещ не принадлежат даже к сестринским таксонам и дифференцированы по размеру генома, тела и другим морфологическим признакам [Briolay et al., 1998]. Несмотря на межвидовые различия, вспышки гибридизации отмечают в зонах вторичного контакта. Численность межродовых гибридов в отдельных популяциях может достигать 90%, при этом 97% из них имеют мтДНК леща, т.е. скрещивания происходят исключительно в направлении самка более крупного по размеру тела леща × самец более мелкой плотвы (♀A>♂R) [Hayden et al., 2010].

Предотвращение образования гибридов ♀плотва — ♂лещ в естественных условиях связано с наличием пре- и постзиготической

изоляции [Stolbunova et al., 2020]. Различия по размеру тела позволяют более мелким самкам плотвы нереститься в недоступных для леща мелководьях, при этом размерный диморфизм данных видов генетически обусловлен [Stolbunova, Borovikova, 2023]. Увеличение размера тела связывают с отбором на аэробную приспособленность [Lane, 2011], что может быть следствием увеличения размера генома и снижения скорости мутаций генов дыхательной цепи митохондрий, которые совместно с ядерными генами обеспечивают синтез АТФ. Размер генома и динамику клеточного цикла в настоящее время предлагается добавить к набору характеристик, на которые действует отбор, влияя на распределение признаков, включая размер тела, время генерации, продолжительность жизни [Zhang, Zhang, 2021]. Так, снижение вариабельности COX1 в два раза у *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758) (Cyprinidae) по сравнению с *L. leuciscus* (Linnaeus, 1758) вело к двукратному увеличению этих

характеристик [Stolbunova, Borovikova, 2023]. Среди рыб семейства карповых лещ имеет самый низкий уровень полиморфизма генов, кодирующих субъединицы цитохром *c*-оксидазы (*cyt c* — COX) и *cyt b* мтДНК, что обеспечивает высокую совместимость с продуктами соответствующих собственных ядерных генов и высокополиморфных ядерных генов плотвы [Stolbunova, Kodukhova, 2023]. Медленная скорость накопления мутаций в генах мтДНК леща способствует точному соответствию митохондриально-ядерных дыхательных комплексов и увеличению размеров тела.

Увеличение размера генома эукариот стало возможным после включения митохондрий в аппарат клетки [Lane, Martin, 2010]. Предположительно, изменяя количество ДНК, клетка способна регулировать скорость метаболизма и уровень генетической изменчивости, которая отрицательно коррелирует с размером генома у эукариот [Pierce, Mitton, 1989]. Размер генома леща больше, чем у плотвы в 1.3 раза: 2.0 — плотва, 2.6 — лещ [Гинатулин, 1984 (Ginatulin, 1984)]; 0.98 — плотва, 1.26 — лещ [Gregory, 2013]. Это ведет к увеличению объема клеток, размера ядер, продолжительности митоза, времени развития на пять часов и замедлению скорости метаболизма, которая в свою очередь, положительно коррелирует со скоростью замен в мтДНК и утечкой свободных радикалов [Лапушкина, 2002 (Lapushkina, 2002); Prokopowich et al., 2003; Vinogradov, Anatskaya, 2006]. Показаны межвидовые различия плотвы и леща по времени активации изоферментов, скоростям и срокам морфогенеза [Крыжановский, 1949 (Kryzhanovskiy, 1949)]. С увеличением объема клеток увеличивается синтез белка и число копий рибосомных генов (рДНК), а со снижением скорости метаболизма снижается число митохондрий на клетку, что влияет на уровень экспрессии генов. Соответственно, геномы плотвы и леща отличаются по соотношению, количеству и вариативности регуляторных элементов, поскольку у плотвы число копий рДНК меньше числа копий мтДНК [Stolbunova, Kodukhova, 2023]. Снижение синтеза белка и размера клеток у карповых рыб связывают с наличием скрытых разрывов, которые обнаружены в 10% эволюционно-консервативного компонента 28S рДНК у диплоидного леща и в 90% 28S рДНК у тетраплоидных карповых. Скрытые разрывы способствуют ранней деградации и быстрому обороту зрелой рРНК, понижая число рибосом [Лейпольдт, Шмидтке, 1986 (Leipoldt, Schmidtke, 1986)]. Кроме того, разрывы могут быть причиной высокого уровня нестабильности локуса рДНК

карповых рыб, что обеспечивает глобальную стабильность всего генома.

Различия видов по размеру генома и в семействах повторяющихся последовательностей могут приводить к снижению приспособленности гибридов в результате конкуренции регуляторных элементов [Flavell, 1982]. У гибридов растений и животных донорный геном самца претерпевает генетические изменения к уровню материнского вида, при этом сокращение количества ДНК имеет более негативные последствия, чем наращивание повторов [Volkov et al. 1999; Столбунова, Кодухова, 2021 (Stolbunova, Kodukhova, 2021)]. Соответственно, различие в количестве ДНК при гибридизации может быть механизмом генетической изоляции и видообразования, учитывая, что избыточная ДНК может изменять характер онтогенетической регуляции генов, влияя на их экспрессию, синтез белков и выступая в роли энхансеров и сайленсеров для различных генов [Бердников, 1991 (Berdnikov, 1991)].

В настоящем исследовании изучен полиморфизм кодирующей (неспецифические эстеразы) и некодирующей ДНК (RAPD-анализ) плотвы и леща, ее уникальных и повторяющихся последовательностей, охватывая геном в целом, для выявления связи с размером генома. Неспецифические эстеразы (НЭ) выбраны в качестве маркера для анализа кодирующей ДНК, которая составляет всего 1.5% генома и является более консервативной [Патрушев, Минкевич, 2007 (Patrushev, Minkevich, 2007)]. Эстеразы катализируют превращение карбоксильных эфиров в биоактивные кислоты и спирты, благодаря чему играют ключевую роль в регуляции сигнальных молекул и биоактивности эндогенных продуктов [Рудакова и др., 2016 (Rudakova et al., 2016)]. Эстеразы сыворотки крови леща верхневолжских водохранилищ изучались ранее [Кузьмин, 1984 (Kuzmin, 1984); Хлыстов, 1998 (Khlystov, 1998); Столбунова, Хлыстов, 2003 (Stolbunova, Khlystov, 2003)]. В данном исследовании анализ проведен по четырем видам ткани плотвы и леща, что позволяет составить более полную картину экспрессии данного фермента. RAPD-маркеры обладают менделевским наследованием, как правило, доминантного типа, позволяют получать фрагменты тотальной ДНК длиной от 100 до 2500 п.н. и имеют множественную локализацию в геноме, в основном в некодирующей области ДНК. Скорость мутирования повторяющейся ДНК вдвое выше, чем в кодирующей области, поскольку она в меньшей степени подвержена селективным ограничениям [Nei, 1987]. Метод полимеразной цепной

реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR) успешно использовался для физического картирования геномов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Внутри- и межвидовую изменчивость изучали на выборках плотвы (*Rutilus rutilus*) и леща (*Abramis brama*) Рыбинского водохранилища. Для RAPD анализа отлов рыб произведен в 2007 г., использовано по 5 особей леща и плотвы.

Электрофоретический анализ проводился в летне-осенний период 1996, 1997 и 2001 гг. Для анализа неспецифических эстераз (НЭ) использовали: сердечную и скелетную мышцы, печень у 30 экземпляров плотвы и 280 особей леща. Плотва отловлена в июле 2001 г. из р. Суноги (приток Волги второго порядка Рыбинского вдхр.). Леща отлавливали в трех водохранилищах: Рыбинском (в 1997 г., р-н Моложского плеса), в Угличском (р-н с. Прилуки) и Горьковском (р-н пос. Туношна). Исследования спектров эстераз сыворотки крови леща проводили по пяти выборкам: Углическое (У07.1996), Горьковское (Г07.1996), Рыбинское (Р09.1996), Рыбинское (Р07.1997) и Горьковское водохранилища (Г07.1997). В 2021 г. проведен анализ сердечной мышцы 35 особей леща, выловленного в Рыбинском водохранилище, для контроля динамики редких генотипов.

Методы исследования. *Забор и получение сыворотки крови.* Забор крови производили из хвостовой вены. Для выделения тотальной ДНК кровь консервировали в 0.05 М растворе ЭДТА (рН 8.0) и хранили при температуре +4°C. Для получения сыворотки, пробирку с кровью выдерживали в холодильнике при +4°C в течение ночи, после чего жидкость над сгустком осторожно отбирали пипеткой и переносили в чистую пластиковую пробирку и использовали для электрофореза.

Выделение ДНК проводили с помощью набора Diatom100. Для выявления геномной вариативности использовали шесть случайных праймеров следующего состава: OPA11-5'-CAATCGCCGT-3', OPA17-5'-GACCGCTTGT-3; OPA19-5'-CAAACGTCGG-3'; P29-5'-CCG GCCTTAC-3'; OPA20-5'-GGTCTAGAGG-3'; SB2-5'-GACGGCCAGTATT-3'.

RAPD-PCR. Реакцию амплификации со случайными праймерами осуществляли на термощиклере Терцик. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 67 мМ трис- HCl (рН-8.8), 16.6 мМ сульфата аммония, 0.01% твин-20, по 0.3 мМ каждого dNTP, 60 мМ MgCl₂, 1 мкМ праймера, 0.9 ед. Tag-полимеразы и 25 — 100 нг

Цель исследования изучить геномное разнообразие плотвы и леща с помощью неспецифических эстераз и набора случайных RAPD маркеров.

тотальной ДНК. Каждый цикл полимеразной реакции состоял из денатурации (94°C, 2 мин), отжига (45°C, 1 мин), элонгации (72°C, 2 мин). Циклы повторялись 35 раз, первый цикл предварительно денатурацией в течение 5 мин при температуре 94°C. После окончательной достройки амплифицированной ДНК (72°C, 2 мин) прибор снижал температуру до +4°C.

Электрофорез. 1. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1.5%-ном агарозном геле толщиной 7–10 мм, содержащем бромистый этидий. В качестве маркеров молекулярной массы использовали 100 bp и 1 kb Ladder “Fermentas”. 2. Электрофорез проводили в системе 7%-ного геля с рН буферной системы 8.9. Пробы вносили в 60%-ой сахарозе (приготовленной на электрофорезном буфере). После окончания электрофореза гель инкубировали 30 минут в 0.1-м фосфатном буфере (рН 6), где был растворен субстрат (α -нафтилацетат, в концентрации 0.02%), при 20°C. Затем гель ополаскивали в дистиллированной воде и помещали для выявления эстераз на 30–45 мин. в буфер с добавлением субстрата и красителя (прочный синий РР в концентрации 0.04%). После выявления фермента гели промывали и фиксировали в 7%-ной уксусной кислоте.

Обработка данных. На основании RAPD электрофореграмм были составлены бинарные матрицы для двух и семи праймеров, где отсутствие или присутствие в образце фрагмента обозначали как 0 и 1. Используя матрицы для каждой выборки рассчитывали следующие коэффициенты: среднее число фрагментов индивидуальных спектров (N); общее число фрагментов (L); долю полиморфных локусов (P, %); среднее внутригрупповое сходство:

$$APS = \sum S/n,$$

где n — число индивидуумов в группе,

$S = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, — сходство между каждой парой особей внутри группы (N_x и N_y — число фрагментов, выявляемых у особей x и y, соответственно, N_{xy} — число одинаковых фрагментов у особей x и y). Для построения неукорененного дерева, иллюстрирующего генетические отношения между отдельными особями, использовали парногрупповой метод для невзвешенных средних (UPGMA) из пакета прикладных программ TREECON [Van der Peer, 1994].

Сравнение проведено по трем зонам активности с большей молекулярной массой,

гетерогенность оценивали по качественному и количественному составу эстеразных фракций. Обозначение зон эстеразной активности проводили в порядке увеличения электрофоретической подвижности к аноду. Обозначение локусов и анализ генетической интерпретации наблюдаемого полиморфизма производилось в соответствии с общепринятыми правилами генетической номенклатуры [Shaklee et al.,

1989]. Для статистической обработки использовали модифицированный χ^2 -критерий по Животовскому, а также тест на гетерогенность [Животовский, 1991 (Zhivotovsky, 1991)]. Оценивали достоверность различий теоретически ожидаемых из равновесия Харди–Вайнберга и фактически наблюдаемых частот генотипов и фенотипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

RAPD-PCR со случайными праймерами. В предварительных экспериментах нами было опробовано 9 случайных праймеров, из которых для последующего анализа геномной ДНК было отобрано семь (OPA01, OPA17, OPA19, OPA10, P29, OPA09, R45), позволяющих выявлять четкие, стабильно воспроизводимые спектры, дифференцирующие исследуемые виды. На рисунке 1 показаны индивидуальные спектры леща и плотвы, полученные с помощью праймеров Opa17 и R45.

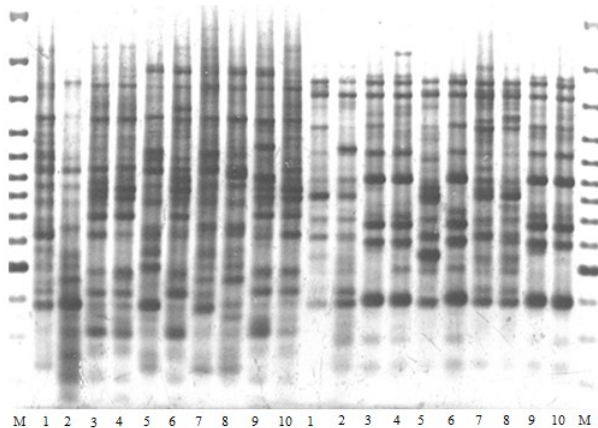


Рис. 1. Индивидуальные спектры ДНК плотвы (1, 2, 5, 7, 8) и леща (3, 4, 6, 9, 10) по праймерам R45 и Opa17. М-маркер молекулярных масс (1kb).

Fig. 1. Individual DNA spectra of roach (1, 2, 5, 7, 8) and bream (3, 4, 6, 9, 10) by primers R45 and Opa17. M-marker of molecular masses (1kb).

Маркер OPA-17 давал хорошо воспроизводимые фрагменты ДНК в области 200–1500 п.н.: 31 у плотвы и 29 у леща. Количество фрагментов в индивидуальных спектрах варьировало от 18 до 23, при этом выборки плотвы и леща не различались между собой по среднему значению N ($p < 0.0001$) (табл. 1), которое составило для плотвы и леща: 21.0 ± 1.1 и 20.2 ± 0.8 , соответственно. Семь фрагментов оказались мономорфными, общими для обоих видов. Однако надо учитывать, что сходство фрагмента по размеру не означает сходства его нуклеотидной последовательности. Число видоспецифических мономорфных локусов составило 5 для плотвы, 3 для леща. Обе выборки по данному праймеру демонстрируют высокую степень

внутригруппового сходства, этот показатель для плотвы составил — 80.0 ± 0.16 ; для леща — 82.0 ± 0.12 . Уровень полиморфизма невысокий: 58.0% и 48.0% для плотвы и леща соответственно (табл. 1).

Маркер R45 выявил в спектрах двух видов 52 фрагмента размером от 100 до 2500 п.н., из них 3 мономорфных фрагмента оказались общими для обоих видов. В спектрах показана высокая индивидуальная генетическая изменчивость, что хорошо визуально дифференцирует особей разных видов за счет низкого количества мономорфных видоспецифических локусов (1 у плотвы и 4 у леща). В индивидуальных спектрах отмечено от 24 до 31 фрагмента по среднему значению N ($p < 0.0001$), которое составило 24.8 ± 0.7 для плотвы и 29.4 ± 0.92 для леща, выборки достоверно различаются между собой. Уровень полиморфизма плотвы и леща составил 85.0% и 57.0%, степень внутригруппового сходства — 64.0 ± 0.03 и 0.80 ± 0.02 соответственно.

При суммировании данных по двум праймерам, общее число локусов составило 89, число фрагментов в индивидуальных спектрах плотвы и леща варьировало в пределах 42–53. Из них 10 оказались общими для данных видов. Число выявляемых локусов в геноме плотвы и леща составило 72 и 71, видоспецифических мономорфных фрагментов 18 и 33, соответственно. Выборки достоверно различаются между собой по среднему значению и коэффициенту сходства ($tg = -4.8$; $p < 0.0001$). Обе выборки высокополиморфны, доля полиморфных локусов составила для плотвы — 74%, для леща — 53%. Средние уровни генетического сходства внутри выборок варьируют в пределах 64.0–82.0%, причем выборка леща наиболее гомогенна.

Дендрограмма генетического сходства показывает разделение видов на два кластера с 100% индексом бутстрепа свидетельствует о надежности объединений (рис. 2). Значения внутригруппового сходства в выборке плотвы варьируют в пределах 0.16–0.33, леща — 0.15–0.21. По разбросу индекса внутригруппового сходства родство относительно невелико.

Таблица 1. Генетический полиморфизм в выборках плотвы и леща по двум праймерам**Table 1.** Genetic polymorphism in roach and bream samples using two primers

Вид / Species	Количество локусов / Number of loci					N±σ	S	P, %
	1	2	3	4	5			
Праймер R45								
Плотва	23	24	24	26	26	24.8±0.70	0.64±0.029	85.0
Лещ	29	26	31	31	30	29.4±0.92	0.80±0.019	57.0
Праймер ОРА17								
Плотва	20	23	18	20	24	21.0±1.10	0.80±0.016	58.0
Лещ	20	21	19	22	19	20.2±0.80	0.82±0.012	48.0
Суммарно по обоим праймерам								
Плотва	43	47	42	46	50	45.6±1.43	0.72±0.018	74.0
Лещ	49	47	50	53	49	49.6±0.93	0.81±0.008	53.0

Примечание. N±σ — среднее число фрагментов в индивидуальных спектрах; S — коэффициент сходства между каждой парой особей внутри группы; P — полиморфные локусы.

Note. N±σ — average number of fragments in individual spectra; S — coefficient of similarity between each pair of individuals within a group; P — polymorphic loci.

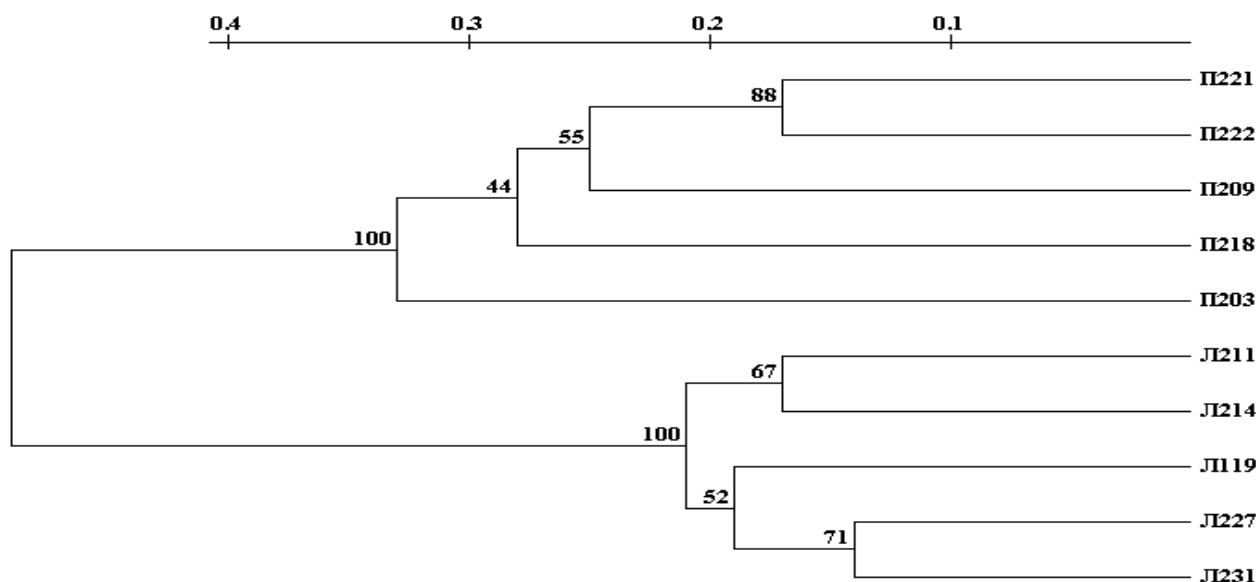


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства по двум праймерам особей плотвы (П221, П222, П209, П218, П203) и леща (Л211, Л214, Л119, Л227, Л231); вверху — шкала генетического сходства по Ней; цифровые значения в узлах ветвления — индекс бутстрепа (%).

Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity for two primers of roach (П221, П222, П209, П218, П203) and bream (Л211, Л214, Л119, Л227, Л231) individuals; at the top is the scale of genetic similarity according to Nei; digital values at branching nodes are the bootstrap index (%).

При исследовании специфики праймеров были получены следующие результаты. Общее генетическое разнообразие выборок, т.е. число RAPD-фрагментов разного размера по семи праймерам составило для плотвы и леща 146 и 161 соответственно. Из них общими для обоих видов оказались 34 локуса (табл. 2). Все используемые праймеры давали четкие картины межвидовой дифференциации благодаря наличию в спектрах видоспецифических мономорфных фрагментов: 42 локуса у леща и 41 у плотвы. Наименьшее число фрагментов в индивидуальных спектрах у исследуемых видов отмечено по праймеру Ора19, наибольшее — по R45.

Таким образом, RAPD-анализ показал более низкую индивидуальную изменчивость особей леща и высокий уровень геномного разнообразия некодирующей ДНК обоих видов.

Полиморфизм неспецифических эстераз в выборках плотвы и леща. В крови леща Нейманом [Nyman, 1965] обнаружена одна, а Таммертом [Таммерт, 1980 Tammert, 1980] — две зоны эстеразной активности. При изучении электрофореграмм сыворотки крови леща выявлено две зоны эстеразной активности (*Est-1* и *Est-2* в порядке увеличения электрофоретической подвижности), что обозначено на рисунке 3Б фенотипами 1 и 2. Зона *Est-1* расположена

в области α_2 -глобулинов и присутствует лишь у части особей, что указывает на индивидуальную изменчивость, которая выражается в наличии или отсутствии активности и различной подвижности аллельных вариантов. Зона *Est-2* основная, расположена в области β -глобулинов, присутствует у всех особей и представлена одним фрагментом с высокой активностью (рис. 3, 4). Е.В. Кузьминым были описаны третий (Рыбинское вдхр.) и четвертый (Верхняя Волга) фенотипы [Кузьмин, 1987 (Kuzmin, 1987)], когда происходило разделение зон *Est-1* и *Est-2* на два компонента. В 1980 г. фенотип 4 не был обнаружен в Рыбинском, Горьковском и Угличском водохранилищах, а шестнадцать лет спустя выявлен в трех выборках: У07.1996, У09.1997 и Р07.1997. Кроме того описан пятый фенотип, который может быть модификацией 3-го фенотипа с одним быстрым компонентом в зоне *Est-1*. Первый и второй фенотипы широко представлены в выборках 1997 и 1980 гг., частота их встречаемости составила 0.62 для 1 фенотипа (1980 — 0.76) и 0.38 для второго фенотипа (1980 — 0.21). Остальные варианты фенотипов были редкими: 3-й (0.14), 4-й (0.02), 5-й (0.1). Анализ популяционной изменчивости проводили на уровне фенотипов эстераз сыворотки крови леща, количественное соотношение фенотипов представлено в таблице 3. Тест на гетерогенность показал отсутствие

достоверных различий между выборками трех водохранилищ (Г, У и Р) за 1996 г., тогда как, выборки из Угличского вдхр. 1996 и 1997 гг. достоверно различались ($p < 0.05$). При сравнении с результатами 1980 г. были получены достоверные различия между выборками по всем изученным водоемам ($p < 0.05$).

Анализ спектров тканей леща выявил дифференциальный паттерн экспрессии: в печени — три зоны эстеразной активности (*Est-1*; *Est-2*; *Est-3*) и две зоны в сердечной и скелетной мышцах (*Est-1*; *Est-2*), совпадающих по составу фракций с зонами в сыворотке (рис. 3). В “быстрой” области спектра эстераз печени и сердечной мышцы леща дополнительно присутствует 2–6 компонентов, которые отмечаются не у всех особей и не во всех выборках. Зона *Est-1* тканеспецифична, имеет высокую активность в печени, в то время как в сыворотке активность фракций низкая или отсутствует вообще. В скелетной/сердечной мышцах леща зона *Est-1* представлена тремя фрагментами, поэтому тестирована по трехалельной системе кодирования (табл. 4). Выявлено три генотипа из шести, преимущество на стороне гомозигот АА. Проверка соотношения частот встречаемости генотипов по Харди–Вайнбергу показала хорошее соответствие ($\chi^2_{\text{g}} = 2.09$; $\chi^2_{\text{st}} = 6.07$; $\text{df} = 2.03$). При этом в 2021 г. анализ зоны *Est-1* у 35 особей леща подтвердил результат 1997 г.

Таблица 2. Специфические особенности RAPD-маркеров леща и плотвы

Table 2. Specific features of RAPD markers for bream and roach

Вид, геномные характеристики / Species, genomic characteristics	Праймеры / Primers							Σ
	Opa01	Opa19	Opa29	Opa09	Opa10	R45	Opa17	
Плотва1	15	10	14	13	20	26	20	118
Плотва2	16	10	15	17	17	26	24	125
Общие локусы	14	7	11	9	15	21	18	95
Нм	10	4	6	6	9	1	5	41
S	0.90	0.70	0.75	0.60	0.81	0.80	0.81	0.76±0.03
Лещ1	22	12	22	14	17	29	20	136
Лещ2	20	9	23	13	11	26	21	123
Общие локусы	16	8	17	6	11	24	16	101
Нм	8	7	10	5	5	4	3	42
S	0.76	0.76	0.76	0.44	0.78	0.87	0.78	0.74±0.05
Плотва (1;2)	31	20	29	30	37	52	44	146
Лещ (1;2)	42	21	47	27	28	55	41	161
Общие локусы	4	2	4	2	5	3	7	34
S	0.30	0.20	0.37	0.29	0.37	0.47	0.53	0.36±0.10

Примечание. S — коэффициент сходства между каждой парой особей внутри группы. Нм — число мономорфных видоспецифических фрагментов.

Note. S — the coefficient of similarity between each pair of individuals within a group. Нм — the number of monomorphic species-specific fragments.



Рис. 3. Схематическое изображение картины эстеразных фракций печени, скелетной/сердечной мышц плотвы (А) и леща (Б). Зоны *Est-2* и *Est-3* идентичны во всех тканях. В сыворотке крови леща показаны пять фенотипов. Стрелка показывает электрофоретическую подвижность фракций по отношению к аноду.

Fig. 3. Schematic representation of the esterase fraction pattern of liver, skeletal/cardiac muscle of roach (A) and bream (B). The *Est-2* and *Est-3* zones are identical in all tissues. Five phenotypes are shown in bream serum. The arrow shows the electrophoretic mobility of the fractions relative to the anode.

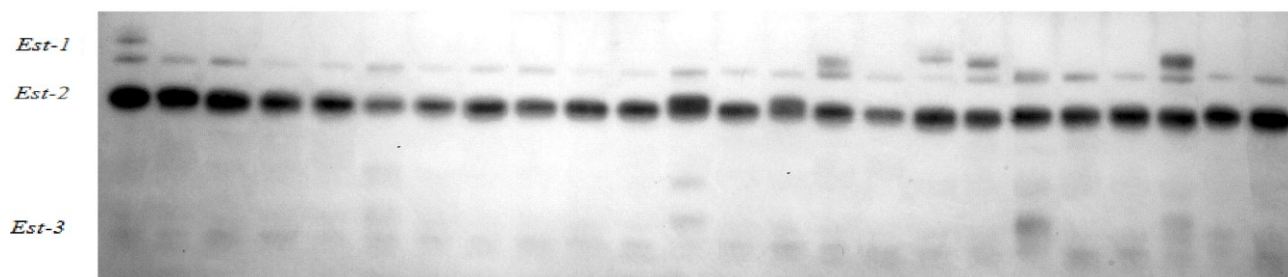


Рис. 4. Электрофореграмма неспецифических эстераз сердечной мышцы леща. *Est-1*, -2, -3 — изоформы эстераз, выделенные согласно рис. 3.

Fig. 4. Electrophoregram of nonspecific esterases of bream heart muscle. *Est-1*, -2, -3 are the esterase isoforms identified according to Fig. 3.

Таблица 3. Соотношение фенотипов эстераз сыворотки крови леща ($p < 0.05$)

Table 3. Ratio of esterase phenotypes in bream blood serum ($p < 0.05$)

Выборка / Sample	<i>n</i>	Фенотип / Phenotyp					χ^2_g ; χ^2_{st} (df)
		1	2	3	4	5	
P1980	50	37	11	2	—	—	1.35 < 8.55 (3.4)
Y1980	18	16	3	—	—	—	
Всего:	68	53	14	2	—	—	10.38 < 22.01 (12.5)
P09.1996	29	19	2	5	—	3	
Y07.1996	30	21	1	6	1	1	
Г07.1996	27	18	3	6	—	—	
Всего:	86	58	6	17	1	4	1.60 < 11.41 (5.2)
P07.1997	30	18	5	1	1	5	
Y09.1997	30	14	7	2	1	6	
Всего:	60	32	12	3	2	11	

Примечание. χ^2_g — фактический хи-квадрат; χ^2_{st} — теоретический хи-квадрат; df — степень свободы, *n* — число особей; “—” — нет данных.

Note. χ^2_g — actual chi-square; χ^2_{st} — theoretical chi-square; df — degree of freedom, *n* — number of individuals, “—” — not date.

Таблица 4. Частоты генотипов по трем локусам эстераз сердечной мышцы леща и плотвы**Table 4.** Genotype frequencies for three esterase loci in the cardiac muscle of bream and roach

Локус / Locus	Вид / Species	Год / Year	n	Частоты генотипов / Genotype frequency									
				AA	BB	CC	AB	AC	BC	DD	AD	BD	CD
<i>Est-2</i>	Лещ	1980	192	—	0.99	—	0.004	—	—	—	—	—	—
		1997	268	—	0.94	—	0.04	—	0.02	—	—	—	—
		2021	35	—	0.94	—	0.06	—	—	—	—	—	—
	Плотва	2001	30	0.07	0.17	0.1	0.43	0.23	—	—	—	—	—
<i>Est-1</i>	Лещ	1997	155	0.74	—	—	0.07	0.19	—	—	—	—	—
		2021	35	0.71	—	—	0.14	0.14	—	—	—	—	—
	Плотва	2001	30	0.07	0.33	0.23	0.1	0.07	0.07	—	0.03	0.07	0.03

Примечание. n — число особей, “—” — нет данных.

Note. n — number of individuals, “—” — not date.

Зона *Est-2* характеризуется отсутствием тканеспецифичности, имеет высокую активность во всех тканях, представлена одним компонентом с преимуществом по частоте встречаемости 0.94 в исследованиях 1996–1997 и 2021 гг. и обозначена, как генотип BB (табл. 4). В редких случаях показано разделение зоны на два компонента (соответствует фенотипу 4 в сыворотке на рис. 3) с частотой встречаемости 0.06, а в 1980 году данный генотип был представлен в выборке с частотой 0.004. При обработке четырех выборок 1997 г. в зоне *Est-2* выявлен еще один редкий вариант — генотип BC с быстрым аллелем. Тест на гетерогенность по трехаллельной системе генного контроля не выявил достоверных различий между выборками, данная гипотеза соответствует соотношению частот встречаемости генотипов по Харди–Вайнбергу ($\chi^2 g = 0.04$; $\chi^2 st = 1.86$; $df = 7.16$). Зона *Est-3* печени у большинства особей представлена одним компонентом, частота встречаемости редкого варианта с двумя фрагментами составила 0.06.

При изучении электрофореграмм печени, сердечной и скелетной мышц плотвы выявлены три зоны эстеразной активности (*Est-1*, *Est-2*,

Est-3 в порядке увеличения электрофоретической подвижности). Отсутствие тканеспецифичности на основании сходства изоферментного состава отмечено по двум зонам *Est-2*; *Est-3* (рис. 1). Зона *Est-1* в печени имеет высокую активность и не поддается генетической интерпретации, что обеспечивает тканеспецифичность спектру данного органа, отличается от зоны *Est-1* сердечной и скелетной мышц, как у леща. Зона *Est-2* представлена тремя фрагментами в разных сочетаниях, из шести ожидаемых генотипов встречено пять, преимущество на стороне гетерозигот (табл. 4). Для зоны *Est-3* предложена четырехаллельная система генного контроля, из десяти ожидаемых генотипов выявлены девять. Проверка равновесия по Харди–Вайнбергу показала достоверные различия по соотношению теоретически ожидаемого и фактического распределения фенотипов эстераз по зонам *Est-2* и *Est-3*, что, вероятно, связано с малым количеством особей в выборке. На основании отсутствия тканеспецифичности по данным зонам принято считать, что они являются продуктами самостоятельных локусов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптационные и эволюционные изменения в популяциях основываются на генетическом разнообразии, которое вместе с тем выступает одним из важнейших показателей их устойчивости и определяется сложным переплетением взаимодействий основных факторов микроэволюции — естественного отбора, генных мутаций, случайного дрейфа и миграции генов [Алтухов, 2003 (Altukhov, 2003)]. Изучение биохимического полиморфизма продиктовано необходимостью оценить генетический потенциал существующих групп [Кирпичников, 1987 (Kirpichnikov, 1987)], который определяется уровнем гетерозиготности. Однако известно, что уровень генетической изменчивости

отрицательно связан с таким параметром, как размер генома, который во многом определяет за счет каких последовательностей, будут происходить быстрые адаптационные и формообразовательные изменения. Так, при отсутствии большого объема ДНК отбор благоприятствует мутациям в структурных генах, и наоборот, когда для регуляторной функции доступны большие количества повторяющейся ДНК, отбор будет способствовать разнообразию регуляторных генов, а вариация в структурных белковых локусах будет низкой [Pierce, Mitton, 1989]. Соответственно, различия между генотипами в первом случае обеспечиваются за счет новых аллельных состояний, а во втором — за счет обратимых

менее значимых изменений некодирующей ДНК, что свидетельствует о разных источниках потенциальной энергии (эволюционном потенциале) и скорости переработки энергии окружающей среды в этих двух системах.

Некодирующая ДНК в межгенных и интронных областях является основой эпигенетической наследственности с возможностью быстро передаваться непропорционально большому числу потомков и гомогенизировать популяции между собой путем согласованной эволюции [Gangloff et al., 1997; Мустафин, Хуснутдинова, 2017 (Mustafin, Khusnutdinova, 2017)]. Следствием данных процессов может быть высокий индекс генетического сходства и большое число мономорфных видоспецифических локусов по RAPD-маркерам в выборке леща, что указывает на низкую индивидуальную изменчивость и большое сходство особей между собой, подтвержденное литературными данными [Хрисанфова и др., 2004 (Khrisanfova et al., 2004)]. Анализ некодирующей ДНК плотвы и леща с использованием мультилокусных маркеров позволил дифференцировать исследуемые виды так же надежно (рис. 2), как это происходит при анализе фрагментов структурных генов мтДНК. Все маркеры оказались информативными с высокой степенью видоспецифичности. При суммировании данных по семи RAPD-маркерам в геноме леща выявлено большее число (161) фрагментов, чем в геноме плотвы (146), что может быть связано с большим размером генома леща (табл. 1, 2). Доля полиморфных локусов у плотвы (74%) и леща (53%) свидетельствует о высоком уровне изменчивости некодирующей ДНК обоих видов.

Относительно гетерогенности изоферментных спектров неспецифических эстераз исследуемых видов получены значительные различия (рис. 3) с более высоким уровнем электрофоретической изменчивости плотвы, что показано ранее и по другим белковым локусам (bPGD, AAT, LDG) [Слынько, 1991, 1992 (Slynko, 1991, 1992)]. Одинаковое число выявленных зон активности неспецифических эстераз и сходство их по электрофоретической подвижности у плотвы и леща свидетельствуют о том, что не только близкородственные виды [Алферова, 1973 (Alferova, 1973)], но и виды с отдаленным родством могут иметь большое сходство в картине эстеразных фракций. Изоферментный спектр эстераз находится под контролем нескольких неаллельных генов [Серов, 1977 (Serov, 1977)]. В печени, сердечной/скелетной мышцах леща фиксируются продукты трех локусов, две зоны в сердечной и скелетной мышцах (*Est-1*; *Est-2*), совпадающих по составу

фракций с зонами в сыворотке. Два локуса в скелетной мышце леща было выявлено методом электрофореза в крахмальном геле [Wolter, 1999]. У плотвы наблюдается активность в трех зонах во всех тканях, каждая из которых имеет от трех до четырех аллелей. Пять аллелей в зоне *Est-3* у плотвы выявлено в другом исследовании [Андреева, 2008 (Andreeva, 2008)].

Считается, что прогрессивное увеличение числа локусов изоферментов произошло при переходе от древних к эволюционно более молодым рыбам путем дупликации анцестрального локуса и последующей дивергенции этих локусов, ведущей к различиям в характеристиках продуцируемых ферментов. На раннем этапе эволюции каждый фермент кодируется одним локусом, в дальнейшем формируется сложная мультилокусная система генов. Появление нескольких зон активности неспецифических эстераз у плотвы и леща, которые различаются по числу компонентов и их экспрессии (содержанию белка), может быть связано с полногеномными или сегментарными дупликациями, которые имели место у карповых рыб в ходе эволюции [Venkatesh, 2003]. При этом у них обнаружен регуляторный механизм, способный уменьшать содержание белка на клетку и вызывать диплоидизацию экспрессии генов [Леопольдт, Шмидтке, 1986 (Leopoldt, Schmidtke, 1986)]. Применительно к функциональным особенностям ферментов, дупликация в эволюции не приводит к увеличению эффективности изофермента, как можно было бы ожидать. Основная функция умножения субъединиц, по-видимому, заключается в контроле активности [Pierron et al., 2012]. Кроме того, одним из генераторов белковых изоформ является альтернативный сплайсинг, благодаря которому с одного структурного гена может считываться несколько структурно и функционально отличающихся белковых изоформ, что лежит в основе тканеспецифичной экспрессии изоферментов [Pankova et al., 2004], а также наблюдаемого мономорфизма по одним зонам и полиморфизма — по другим.

Зона *Est-2* плотвы и леща с отсутствием тканеспецифичности, по-видимому, является продуктом анцестрального локуса, от которого в процессе эволюции образовались все остальные. На энзимограмме сердечной мышцы леща (рис. 4) хорошо видна высокая активность данной зоны, которая долгое время считалась мономорфной [Neman, 1965] и лишь в 1980 г. обнаружен еще один двухкомпонентный генотип АВ (табл. 4), что может быть следствием неаллельных взаимодействий или неадаптивной мутации, частота которой не изменилась

до сегодняшнего дня. Такие случаи уже были описаны в литературе, когда у одного из мелких видов тунцов была найдена двухаллельная изменчивость одного из локусов, кодирующих водорастворимые мышечные белки, хотя этот вид считался мономорфным по этим белкам [Кирпичников, 1987 (Kirpichnikov, 1987)]. В четырех выборках 1997 г. (P08.1997 — 30 экз., У09.1997 — 30 экз., P09.1997 — 30 экз., Г09.1997 — 20 экз.) был найден еще один редкий двухкомпонентный генотип ВС с более быстрым аллелем (табл. 4; рис. 3). При анализе сердечной мышцы 35 особей леща в 2021 г. Из Рыбинского водохранилища выявлено две особи с генотипом АВ и отсутствие генотипа ВС (рис. 4), что могло быть связано с небольшим объемом выборки и его редкостью. Гетерогенность эстераз связывают с широкой субстратной специфичностью, что рассматривается как прямая адаптация к изменяющимся условиям окружающей среды [Корочкин, 1977 (Korochkin, 1977)]. Распределение фенотипов эстераз сыворотки крови и генотипов в выборках трех водохранилищ соответствует закону Харди–Вайнберга, что указывает на генетическое равновесие популяций леща исследуемых водохранилищ, которое, судя по локусам *Est-1* и *Est-2*, не изменилось за 24 года. Это может указывать на то, что адаптивные изменения обеспечиваются в большей степени за счет изменений некодирующей ДНК.

В отличие от леща, высокое аллельное разнообразие наблюдается у плотвы как в зоне *Est-2*, так и в зоне *Est-3* с отсутствием тканеспецифичности (табл. 4). Гетерогенность в форме нескольких аллельных вариантов белков может указывать на высокий уровень полиморфизма структурных генов, кодирующих данный белок, несмотря на преимущество двух типов гомозигот. Не исключено, что некоторые из этих вариантов могут быть селективно нейтральными или функционально эквивалентными [Koehn, Eanes, 1977].

Считается, что характерная черта эволюционных преобразований у животных заключается в возникновении тканеспецифической экспрессии генов мультилокусных изоферментов [Корочкин, 1983 (Korochkin, 1983)]. Спектры ферментов из печени, сердечной мышцы и сыворотки у обоих видов демонстрируют специфичность благодаря зоне *Est-1* с высокой активностью, но по отдельным зонам на основании сходства фракций отмечено отсутствие тканеспецифичности (зона *Est-2* — лещ; *Est-2*, *Est-3* — плотва). Кроме зоны *Est-1* специфичность спектру в печени придает наличие в быстрой области набора фракций из 2-6 компонентов — зона *Est-*

4 — у плотвы встречена во всех выборках, но не у всех особей, у леща не во всех выборках и лишь у части особей. Ткани печени играют существенную роль в адаптации организма к гипоксии и могут наилучшим образом отражать физиологическое и патологическое состояние организма. Нарушение синтеза неспецифических эстераз у млекопитающих ведет к заболеваниям, связанным с обменом гликогена [Райдер, 1983 (Ryder, 1983)]. Возможно, поэтому эстеразы печени имеют специфический изоферментный состав с самой высокой активностью в сравнении с другими тканями.

Предположительно, низкое аллельное разнообразие локусов неспецифических эстераз у леща с высокой экспрессией по сравнению со спектром плотвы может указывать на низкий уровень индивидуальной изменчивости и большее сходство особей между собой, а также на низкую скорость эволюции структурных генов, кодирующих данный белок. Снижение мутаций в структурных генах способствует увеличению уровня их экспрессии согласно универсальной для эукариот закономерности [Koonin, Wolf, 2006]. Соответственно, данные маркеры подтверждают отрицательную корреляцию между размером генома и генетической изменчивостью геномов плотвы и леща, и могут быть вполне информативными для определения эволюционного потенциала и стратегии развития вида. При различии источника потенциальной изменчивости в геномах плотвы и леща, в гибридном геноме для отбора будут доступны как кодирующая ДНК плотвы (разложение и появление новых гетерозигот), так и некодирующая ДНК леща. При этом, как показано при отдаленной гибридизации карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio*, Cyprininae, $2n = 100$) × самца тупого леща-рылоноса (*Megalobrama amblycephala*, Cultrinae, $2n = 48$), для появления жизнеспособного потомства материнский родитель должен обладать большим объемом некодирующей ДНК [Wang et al., 2017], что справедливо для отдаленной гибридизации плотвы и леща.

Наблюдаемая более низкая изменчивость генома леща по обоим маркерам не является показателем низкого потенциала вида, а свидетельствует лишь об особенностях регулирования при увеличении размера генома. Учитывая, что изменение размера генома влияет на время развития и стратегию клеточного дыхания, можно предположить, что расширение генома путем сегментарных дупликаций или его сжатие путем делеций, может замедлить либо ускорить эволюцию вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, показана обратная зависимость между размером генома и уровнем изменчивости структурных генов у плотвы и леща. При анализе геномного разнообразия с помощью неспецифических эстераз и RAPD-маркеров наблюдается низкий уровень индивидуальной изменчивости и большее сходство особей между собой в выборках леща с большим размером генома. Тогда как в выборке плотвы показано высокое аллельное разнообразие всех трех локусов неспецифических эстераз и в два раза меньше мономорфных инвариантных RAPD-локусов, что может быть признаком высокой изменчивости структурных генов. Полученные результаты могут быть интерпретированы как различие регуляторных систем и скорости эволюции данных видов. Высокая скорость эволюции плотвы обеспечивается за счет изменчивости структурных генов, а замедление

эволюции, как и времени развития у леща, может быть следствием большего объема и изменчивости повторяющейся ДНК, учитывая самый низкий уровень мутаций генов мтДНК среди карповых видов рыб. Различие регуляторных систем родительских геномов считалось важнейшим барьером, препятствующим развитию гибридов [Wilson et al., 1974]. По-видимому, это является условием для асимметричной гибридизации рыб и процесса видообразования. В таком скрещивании для появления жизнеспособного потомства материнский родитель должен иметь больший размер генома (число хромосом) и низкую изменчивость структурных генов мтДНК, чем у отцовского родителя. Поскольку микроэволюционные события затрагивают, прежде всего, мономорфную часть генома с необратимой реорганизацией регуляторной системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, в рамках Госзадания (тема №АААА-А19-119102890013-3) №121050500046-8 “Биоразнообразие, структура и функционирование пресноводных рыб континентальных водоемов и водотоков”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
- Алферова Н.М., Нефедов Г.Н. Электрофоретическое исследование мышечных эстераз некоторых видов рыб Восточной Атлантики // Биохимическая генетика рыб: сб. тез. докл. 1-го Всес. Совещания. 1973. С. 195–200.
- Андреева А.А. Структурно-функциональная организация белков крови и некоторых внеклеточных жидкостей рыб. Дис. ... док. биол. наук. Борок, 2008. 271 с.
- Бердников В.А. Эволюция и прогресс. Новосибирск: Наука, 1991. 192 с.
- Гинатулин А.А. Структура, организация и эволюция генома позвоночных. М.: Наука, 1984. 293 с.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 268 с.
- Картавец Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та. 2005. 304 с.
- Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. С. 233–236.
- Корочкин Л.Н., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
- Корочкин Л.Н. Некоторые молекулярные аспекты регуляции экспрессии генов у рыб и других эукариот // Биологические основы рыбоводства: проблемы генетики и селекции. Л.: Наука, 1983. С. 34–51.
- Кузьмин Е.В. Изозимные спектры эстераз сыворотки крови леща (*Abramis brama* L.) реки Волги // Вопросы ихтиологии. 1984. Т. 24. Вып. 3. С. 508–511.
- Крыжановский С.Г. Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб (Cyprinidae и Siluridae) // Труды института морфологии животных. 1949. Вып. 1. 362 с.
- Лапушкина Е.Е. Эколого-генетический анализ раннего развития отдаленных гибридов F1 леща (*Abramis brama* L.), плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и синца (*Abramis ballerus* L.). Дис. ... канд. биол. наук. Борок: ИБВВ РАН, 2002. 144 с.
- Лейпольдт М., Шмидтке И. Экспрессия генов у филогенетически полиплоидных организмов // Эволюция генома. М.: Мир, 1986. С. 217–232.
- Луданный Р.И. Генетическая идентификация и дифференциация представителей семейства Карповых (Cyprinidae). Дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т. биол. гена РАН, 2008. 140 с.
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 742–749. DOI: 10.18699/VJ17.30-0.
- Патрушев Л.И., Минкевич И.Г. Проблема размера геномов эукариот // Успехи биологической химии. 2007, Т. 47. С. 293–370.
- Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М.: Мир, 1983. 103 с.
- Рудакова А.С., Рудаков С.В., Давыдова Н.В. и др. Изоферментный анализ эстераз в зрелых семенах гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 3. С. 327–334. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.3.327rus.

- Серов О.Л. Генетика изоферментов животных и человека // Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. С. 80–149.
- Слынько Ю.В. Полиморфизм мышечных изоферментов карповых рыб СССР. I. Лактатдегидрогеназа // Информационный бюллетень “Биология внутренних вод”. С.-Пб.: Наука, 1991. № 90. С. 75–84.
- Слынько Ю.В. Полиморфизм мышечных изоферментов карповых рыб. III. Малик–энзим // Информационный бюллетень “Биология внутренних вод”. С.-Пб.: Наука, 1992. № 95. С. 64–72.
- Столбунова В.В., Хлыстов Д.Н. Неспецифические эстеразы органов и тканей плотвы Рыбинского водохранилища // Экологические проблемы бассейнов крупных рек-3: сб. тез. докл. международной и молодежной конференции. Тольятти, 2003. С. 275.
- Столбунова В.В. Межгеномный конфликт при отдаленной гибридизации плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и леща (*Abramis brama* L.) // Успехи соврем. биологии. 2017. Т. 137. № 4. С. 361–372. DOI: 10.7868/S0042132417040044.
- Столбунова В.В., Кодухова Ю.В. Наследование ITS1 рДНК у реципрокных гибридов плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и леща *Abramis brama* (L.) в раннем онтогенезе // Успехи соврем. биологии. 2021. Т. 141. № 1. С. 66–77. DOI: 10.31857/S0042132421010233.
- Таммерт М.Ф. Генетическая характеристика леща (*Abramis brama* L.) в некоторых точках ареала // Вид и его продуктивность в ареале. Вильнюс-Паланга. 1980. С. 57–58.
- Хлыстов Д.Н. Неспецифические эстеразы леща Верхней Волги // Экологические проблемы бассейнов крупных рек-2. Тольятти. 1998. С. 265–266.
- Хрисанфова Г.Г., Луданный Р.И., Слынько Ю.В. и др. RAPD фингерпринт леща (*Abramis brama*), плотвы (*Rutilus rutilus*) и гибридов первого поколения лещ × плотва и плотва × лещ // Генетика. 2004. Т. 40, № 10. С. 1432–1436.
- Flavell R.B. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence // Genome Evolution. L.: Academic Press, 1982. P. 301–324.
- Gangloff S., Zou H., Rothstein R. Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 1715–1725.
- Koehn R.K., Eanes W.F. Subunit size and genetic variation of enzymes in natural populations of *Drosophila* // Theor. Pop. Biol. 1977. Vol. 11. P. 330–341. DOI: 10.1016/0040-5809(77)90016-8.
- Koonin E.V., Wolf Y.I. Evolutionary Systems Biology: Links Between Gene Evolution and Function // Curr. Opin. Biotechnol. 2006. Vol. 17. P. 481–487. DOI: 10.1016/j.copbio.2006.08.003.
- Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity // Nature. 2010. Vol. 467. P. 929–934. DOI: 10.1038/nature09486.
- Lane N. Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations // Bioessays. 2011. Vol. 33. P. 860–869. DOI: 10.1002/bies.201100051.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
- Nyman O.L. Species specific protein in freshwater fishes and their suitability for a “Protein taxonomy” // Hereditas. 1965. Vol. 53. P. 117–126.
- Pankova V.V., Pudovkin A.I., Manchenko G.P. Allozymic variation determined by alternatively spliced exon of the GPI gene in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae) // GFI Bull. 2004. Vol. 37. P. 30.
- Pierron D., Wildman D.E., Hüttemann M. et al. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition // Biochim Biophys Acta. 2012. Vol. 1817. № 4. P. 590–597. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.07.007.
- Pierce B.A., Mitton J.B. The relationship between genome size and genetic variation // Am. Nat. 1980. Vol. 116. P. 850–861.
- Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes // Genome. 2003. Vol. 46. P. 48–50.
- Shaklee J.B., Allendorf F., Morisot D.C., Whitt G.S. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: proposed guideline // Trans. Am. Fish. Soc. 1989. Vol. 118. P. 218–227.
- Stolbunova V.V., Kodukhova Yu.V. Nuclear-Cytoplasmic Conflict in Hybrids of Roach *Rutilus rutilus* and Bream *Abramis brama* as a Consequence of the Species Divergence in Body and Genome Sizes // Inland Water Biol. 2023. Vol. 16. № 1. P. 79–91. DOI: 10.1134/S1995082923010157.
- Stolbunova V.V., Pavlova V.V., Kodukhova Yu.V. Asymmetric hybridization of roach *Rutilus rutilus* L. and common bream *Abramis brama* L. in controlled backcrosses: genetic and morphological patterns // Biosyst. Divers. 2020. Vol. 28. № 4. P. 35–42. DOI: 10.15421/012048.
- Stuhlfelder Ch., Mueller M.J., Warzecha H. Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase // European Journal of Biochemistry. 2004. Vol. 271. № 14. P. 2976–2983. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04227.x.
- Van der Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. Vol. 10. P. 569–570.
- Venkatesh B. Evolution and Diversity of Fish Genomes // Curr. Opin. Genet. Dev. 2003. Vol. 13. P. 588–592. DOI: 10.1016/j.gde.2003.09.001.
- Vinogradov A. E., Anatskaya O.V. Genome size and metabolic intensity in tetrapods: a tale of two lines // Proc. Biol. Sci. 2006. Vol. 273. P. 27–32. DOI: 10.1098/rspb.2005.3266.
- Volkov R.A., Borisjuk N.V., Panchuk I.I. et al. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum* // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. P. 311–320.
- Wang S., Ye X., Wang Y. et al. A new type of homodiploid fish derived from the interspecific hybridization of female common carp × male blunt snout bream // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 4189. DOI: 10.1038/s41598-017-04582-z.

- Wilson A.C., Maxson L.R., Sarich V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization // PNAS USA. 1974. Vol. 71. № 7. P. 2843–2847.
- Wolter Ch. Comparison of intraspecific genetic variability in four common cyprinids, *Abramis brama*, *Abramis bjoerkna*, *Rutilus rutilus* and *Scardinius erythrophthalmus*, within and between lowland river systems // Hydrobiologia. 1999. Vol. 364. P. 163–177.

REFERENCES

- Alferova N.M., Nefedov G.N. Ehlektroforeticheskoe issledovanie myshechnykh ehsteraz nekotorykh vidov ryb Vostochnoj Atlantiki [Electrophoretic study of muscle esterases of some fish species of the Eastern Atlantic]. *Biokhimicheskaya genetika ryb: sb. tez. dokl. 1-go Vses. Soveshchaniya*, 1973, pp. 195–200. (In Russia)
- Altukhov Yu.P. Geneticheskie protsessy v populyatsiyakh [Genetic processes in populations]. Moscow, Akademkniga, 2003. 431 p. (In Russia)
- Andreeva A.A. Strukturno-funktsionalnaya organizatsiya belkov krovi i nekotorykh vnekletochnykh zhidkostey ryb [Structural and functional organization of blood proteins and some extracellular fluids of fish]. *Dr. Biol. Sci. Diss. Borok*, 2008. 271 p. (In Russia)
- Berdnikov V.A. Evolyutsiya i progress [Evolution and progress]. Novosibirsk, Nauka, 1991. 192 p. (In Russia)
- Flavell R.B. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence. *Genome Evolution*. Leningrad, Academic Press, 1982, pp. 301–324.
- Gangloff S., Zou H., Rothstein R. Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, pp. 1715–1725.
- Ginatulin A.A. Struktura, organizatsiya i evolyutsiya genoma pozvonochnykh [Structure, organization and evolution of the vertebrate genome]. Moscow, Nauka, 1984. 293 p. (In Russia)
- Kartavtsev Yu.F. Molekulyarnaya evolyutsiya i populyatsionnaya genetika [Molecular evolution and population genetics]. Vladivostok, Izd-vo Dalnevost. un-ta, 2005. 304 p. (In Russia)
- Khlystov D.N. Nespetsificheskie esterazy lescha Verkhnej Volgi [Non-specific esterases of bream from the Upper Volga]. *Ekologicheskie problemy bassejnov krupnykh rek-2*. Tolyatti, 1998, pp. 265–266. (In Russia)
- Khrisanfova G.G., Ludannyj R.I., Slynko Yu.V. et al. RAPD fingerprint lescha (*Abramis brama*), plotvy (*Rutilus rutilus*) i gibridov pervogo pokoleniya lesch × plotva i plotva × lesch [RAPD fingerprint of bream (*Abramis brama*), roach (*Rutilus rutilus*) and first-generation hybrids bream × roach and roach × bream]. *Genetika*, 2004, vol. 40, no. 10, pp. 1432–1436. (In Russia)
- Kirpichnikov V.S. Genetika i selektsiya ryb [Genetics and selection of fish]. Leningrad, Nauka, 1987, pp. 233–236. (In Russia)
- Koehn R.K., Eanes W.F. Subunit size and genetic variation of enzymes in natural populations of *Drosophila*. *Theor. Pop. Biol.*, 1977, vol. 11, pp. 330–341. doi: 10.1016/0040-5809(77)90016-8.
- Koonin E.V., Wolf Y.I. Evolutionary Systems Biology: Links Between Gene Evolution and Function. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, vol. 17, pp. 481–487. doi: 10.1016/j.copbio.2006.08.003.
- Korochkin L.N. Nekotorye molekulyarnye aspekty regulyatsii ekspressii genov u ryb i drugikh eukariot [Some molecular aspects of regulation of gene expression in fish and other eukaryotes]. *Biologicheskie osnovy rybovodstva: problemy genetiki i seleksii*. Leningrad, Nauka, 1983, pp. 34–51. (In Russia)
- Korochkin L.N., Serov O.L., Pudovkin A.I. i dr. Genetika izofermentov [Genetics of isoenzymes]. Moscow, Nauka, 1977. 275 p. (In Russia)
- Kryzhanovskij S.G. Ekologo-morfologicheskie zakonomernosti razvitiya karpovykh, vyunovykh i somovykh ryb (Cyprinidei i Siluruidei) [Ecological and morphological patterns of carp, catfish and loaches fish]. *Trudy instituta morfologii zhivotnykh*, 1949, vol. 1. 362 p. (In Russia)
- Kuzmin E.V. Izozimnye spektry esteraz syvorotki krovi lescha (*Abramis brama* L.) reki Volgi [Isozyme spectra of esterases in the blood serum of bream (*Abramis brama* L.) from the Volga River]. *Voprosy ikhtiologii*, 1984, vol. 24, no. 3, pp. 508–511. (In Russia)
- Lane N. Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *Bioessays*, 2011, vol. 33, pp. 860–869. doi: 10.1002/bies.201100051.
- Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*, 2010, vol. 467, pp. 929–934. doi: 10.1038/nature09486.
- Lapushkina E.E. Ekologo-geneticheskij analiz rannego razvitiya otdalennykh gibridov F1 lescha (*Abramis brama* L.), plotvy (*Rutilus rutilus* L.) i sintsa (*Abramis ballerus* L.) [Ecological and genetic analysis of the early development of remote F1 hybrids of bream (*Abramis brama* L.), roach (*Rutilus rutilus* L.) and blue bream (*Abramis ballerus* L.)]. *Cand. Biol. Sci. Diss. Borok*, 2002. 144 p. (In Russia)
- Lejpoldt M., Shmidtke I. Ekspressiya genov u filogeneticheskikh poliploidnykh organizmov [Gene expression in phylogenetically polyploid organisms]. *Evolyutsiya genoma*. Moscow, Mir, 1986, pp. 217–232. (In Russia)
- Ludannyj R.I. Geneticheskaya identifikatsiya i differentsiatsiya predstavitelej semeystva Karpovykh (Cyprinidae) [Genetic identification and differentiation of representatives of the carp family (Cyprinidae)]. *Cand. Biol. Sci. Diss. Moscow*, 2008. 140 p. (In Russia)
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Nekodiruyushchie chasti genoma kak osnova epigeneticheskoy nasledstvennosti [Non-coding parts of the genome as the basis of epigenetic inheritance]. *Vavilovskij zhurnal genetiki i seleksii*, 2017, vol. 21, no. 6, pp. 742–749. doi: 10.18699/VJ17.30-o. (In Russia)

- Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y., Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
- Nyman O.L. Species specific protein in freshwater fishes and their suitability for a "Protein taxonomy". *Hereditas*, 1965, vol. 53, pp. 117–126.
- Pankova V.V., Pudovkin A.I., Manchenko G.P. Allozymic variation determined by alternatively spliced exon of the GPI gene in *Polydora brevipalpa* (Polychaeta: Spionidae). *GFI Bull*, 2004, vol. 37, pp. 30.
- Patrushev L.I., Minkevich I.G. Problema razmera genomov eukariot [The problem of the size of eukaryotic genomes]. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2007, vol. 47, pp. 293–370. (In Russia)
- Pierce B.A., Mitton J.B. The relationship between genome size and genetic variation. *Am. Nat.*, 1980, vol. 116, pp. 850–861.
- Pierron D., Wildman D.E., Hüttemann M. et al. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012, vol. 1817, no. 4, pp. 590–597. doi: 10.1016/j.bbabo.2011.07.007.
- Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 2003, vol. 46, pp. 48–50.
- Rajder K., Tejlor K. Izofermenty [Isoenzymes]. Moscow, Mir, 1983. 103 p. (In Russia)
- Rudakova A.S., Rudakov S.V., Davydova N.V. et al. Izofermentnyy analiz esteraz v zrelykh semenakh geksaploidnoj myagkoj pshenitsy (*Triticum aestivum* L.) [Isoenzyme analysis of esterases in mature seeds of hexaploid soft wheat (*Triticum aestivum* L.)]. *Selskokhozyajstvennaya biologiya*, 2016, vol. 51, no. 3, pp. 327–334. doi: 10.15389/agrobiol-ogy.2016.3.327rus. (In Russia)
- Serov O.L. Genetika izofermentov zhivotnykh i cheloveka [Genetics of isoenzymes of animals and humans]. *Genetika izofermentov*. Moscow, Nauka, 1977, pp. 80–149. (In Russia)
- Shaklee J.B., Allendorf F., Morisot D.C., Whitt G.S. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: proposed guideline. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1989, vol. 118, pp. 218–227.
- Slyenko Yu.V. Polimorfizm myshechnykh izofermentov karpovykh ryb SSSR. I. Laktatdehidrogenaza [Polymorphism of muscle enzymes in carp fish of USSR. I. Lactate dehydrogenases]. *Informatsionnyy byulleten "Biologiya vnutrennikh vod"*. Saint Petersburg, Nauka, 1991, no. 90, pp. 75–84. (In Russia)
- Slyenko Yu.V. Polimorfizm myshechnykh izofermentov karpovykh ryb. III. MaliK–enzim [Polymorphism of muscle enzymes in carp fish. III. Malik–enzyme]. *Informatsionnyy byulleten "Biologiya vnutrennikh vod"*. Saint Petersburg, Nauka, 1992, no. 95, pp. 64–72. (In Russia)
- Stolbunova V.V. Mezhenomnyy konflikt pri otdalenoj gibridizatsii plotvy (*Rutilus rutilus* L.) i lescha (*Abramis brama* L.) [Intergenomic conflict in distant hybridization of roach (*Rutilus rutilus* L.) and bream (*Abramis brama* L.)]. *Uspekhi sovrem. biologii*, 2017, vol. 137, no. 4, pp. 361–372. doi: 10.7868/S0042132417040044. (In Russia)
- Stolbunova V.V., Khlystov D.N. Nespetsificheskie esterazy organov i tkanej plotvy Rybinskogo vodokhranilischa [Non-specific esterases of organs and tissues of roach from the Rybinsk Reservoir]. *Ekologicheskie problemy bassejnov krupnykh rek-3: sb. tez. dokl. mezhdunarodnoj i molodezhnoj konferentsii*. Tolyatti, 2003. 275 p. (In Russia)
- Stolbunova V.V., Kodukhova Yu.V. Nasledovanie ITS1 RDNK u retsiproknnykh gibridov plotvy *Rutilus rutilus* (L.) i lescha *Abramis brama* (L.) v rannem ontogeneze ontogeneze [Inheritance of ITS1 rDNA in reciprocal hybrids of roach *Rutilus rutilus* (L.) and bream *Abramis brama* (L.) in early ontogenesis]. *Uspekhi sovrem. biologii*, 2021, vol. 141, no. 1, pp. 66–77. doi: 10.31857/S0042132421010233. (In Russia)
- Stolbunova V.V., Kodukhova Yu.V. Nuclear-Cytoplasmic Conflict in Hybrids of Roach *Rutilus rutilus* and Bream *Abramis brama* as a Consequence of the Species Divergence in Body and Genome Sizes. *Inland Water Biol.*, 2023, vol. 16, no. 1, pp. 79–91. doi: 10.1134/S1995082923010157.
- Stolbunova V.V., Pavlova V.V., Kodukhova Yu.V. Asymmetric hybridization of roach *Rutilus rutilus* L. and common bream *Abramis brama* L. in controlled backcrosses: genetic and morphological patterns. *Biosyst. Divers.*, 2020, vol. 28, no. 4, pp. 35–42. doi: 10.15421/012048.
- Stuhlfelder Ch., Mueller M.J., Warzecha H. Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *European Journal of Biochemistry*, 2004, vol. 271, no. 14, pp. 2976–2983. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04227.x.
- Tammert M.F. Geneticheskaya kharakteristika lescha (*Abramis brama* L.) v nekotorykh tochках areala [Genetic characteristics of bream (*Abramis brama* L.) in some points of the range]. *Vid i ego produktivnost v areale*. Vilnyus-Palanga, 1980, pp. 57–58. (In Russia)
- Van der Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.*, 1994, vol. 10, pp. 569–570.
- Venkatesh B. Evolution and Diversity of Fish Genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2003, vol. 13, pp. 588–592. doi: 10.1016/j.gde.2003.09.001.
- Vinogradov A. E., Anatskaya O.V. Genome size and metabolic intensity in tetrapods: a tale of two lines. *Proc. Biol. Sci.*, 2006, vol. 273, pp. 27–32. doi: 10.1098/rspb.2005.3266.
- Volkov R.A., Borisjuk N.V., Panchuk I.I. et al. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol. Biol. Evol.*, 1999, vol. 16, pp. 311–320.
- Wang S., Ye X., Wang Y. et al. A new type of homodiploid fish derived from the interspecific hybridization of female common carp × male blunt snout bream. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, p. 4189. doi: 10.1038/s41598-017-04582-z.
- Wilson A.C., Maxson L.R., Sarich V.M. Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *PNAS USA*, 1974, vol. 71, no. 7, pp. 2843–2847.

Wolter Ch. Comparison of intraspecific genetic variability in four common cyprinids, *Abramis brama*, *Abramis bjoerkna*, *Rutilus rutilus* and *Scardinius erythrophthalmus*, within and between lowland river systems. *Hydrobiologia*, 1999, vol. 364, pp. 163–177.

Zhivotovskij L.A. Populyatsionnaya biometriya [Population biometrics]. Moscow, Nauka, 1991. 268 p. (In Russia)

THE INFLUENCE OF GENOME SIZE ON THE POLYMORPHISM OF NON-SPECIFIC ESTERASES AND RAPD MARKERS IN BREAM *ABRAMIS BRAMA* L. AND ROACH *RUTILUS RUTILUS* L.

V. V. Stolbunova

Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,

152742 Borok, Russia, e-mail: vvsto@mail.ru

Revised 30.04.2025

The genome size of the bream *Abramis brama* (L., 1758) is 1.3 times larger than that of the roach *Rutilus rutilus* (L., 1758), indicating a larger volume and diversity of noncoding DNA available for selection, which may be a source of latent genetic variability facilitating better co-adaptation of heterogeneous genomes during distant hybridization between these species. The evolutionary significance of genome size remains unclear. Analysis of random multilocus polymorphism (RAPD) markers and non-specific esterases was performed in *A. brama* and *R. rutilus* to identify the relationship with genome size. These markers cover both coding and non-coding regions of DNA, allowing analysis of the genome as a whole. The total number of loci identified for two RAPD primers in individual spectra of roach and bream was 89, of which 10 were common, and 18 (in roach) and 33 (in bream) were species-specific monomorphic. Both samples were highly polymorphic and differed significantly; the bream sample was more homogeneous. The spectra of non-specific esterases of the liver and skeletal/cardiac muscles of roach and bream were heterogeneous with coinciding electrophoretic mobility of the zones. The main *Est-2* zone with the absence of tissue specificity in both species is a product of an independent locus and is represented by three allelic variants in roach (six genotypes were identified) and one component with high activity in bream. Polymorphism of this zone in bream is manifested by its division into two components with a low frequency of genotype occurrence (0.06), which may be a consequence of a mutation that has no adaptive value. The *Est-1* zone of bream is tissue-specific, in the liver there is one component with high activity, in the heart — three with a predominance of homozygotes, in the serum — two fragments with weak activity and not in all individuals. In roach, the *Est-1* zone of the liver is represented by two fractions with high activity, three components were identified in the heart, and the *Est-3* zone has four allelic variants (nine genotypes). Thus, with an increase in the genome size of bream compared to roach, a decrease in the allelic diversity of esterase loci and a greater similarity of individuals to each other is shown, which may indicate a low variability of the structural genes encoding this protein, and a difference in the regulatory systems of the parental genomes.

Keywords: Cyprinidae, roach, bream, non-specific esterases, RAPD, polymorphism, genome size