



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВРЕМЕНИ ПРОЯВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA L.*), ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS L.*) И МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ F₁

Е.Е. Слынько (фото)

к.б.н., научный сотрудник лаборатории эволюционной экологии ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Е.Г. Скворцова

к.б.н., доцент кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА

Е.Н. Пакунова

м.н.с. лаборатории эволюционной экологии

Ю.В. Слынько

к.б.н., заведующий лабораторией эволюционной экологии

ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

А.Е. Берсенева

магистрант технологического факультета ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА, г. Ярославль

Лактатдегидрогеназа (LDH), супероксиддисмутаза (SOD), малик-энзим (ME), бэтта-нафтилзависимая эстераза (β-EST), аспаратаминотрансфераза (AAT), лещ, плотва, межродовые гибриды

Lactate dehydrogenase (LDH), a superoxide dismutase (SOD), a malik-enzyme (ME), betta-naphthyl esterase (β-EST), aspartate aminotransferase (AAT), a bream, roach, intergeneric hybrids

Современные молекулярно-генетические данные свидетельствуют, что, как правило, при контаминации чужеродных геномов возникают многочисленные нарушения комплиментарности и повышается частота летальных мутаций. В результате, нарушения в согласовании работы контаминирующихся геномов приводят к увеличению числа фенотипических отклонений и повышению смертности [1, 2]. В генотипе отдаленного гибрида, совмещающем в себе чужеродные родительские геномы, последние каким-то образом достигают в работе компромисса. Это позволяет рассматривать гибридов в качестве живой модели для изучения проблемы согласования работы разных геномов в онтогенезе, особенно в таком его критическом периоде, как раннее развитие [3, 4].

Основой нормального роста и развития зародыша, его устойчивости к внешним воздействиям является достижение сбалансированности скоростей морфогенетических и метаболических процессов [5, 6]. Сбалансированность является прямым следствием согласованного проявления материнского и отцовского геномов в организме гибрида. Неоднократно отмечалось, что при отдаленной гибридизации, когда сталкиваются чужеродные геномы, наблюдается сильная структурная реорганизация взаимодействующих геномов [7, 8]. Наиболее значимой в этом отношении является стадия «средней – поздней бластулы», так как именно на этот период приходится начало активации ядерных генов зародыша [9]. Проводимые в течение ряда

лет эксперименты по скрещиванию и выращиванию гибридов плотвы и леща подтверждают эти данные. Другими критическими периодами высокой значимости в раннем развитии являются стадии вылупления личинки и ее перехода на экзогенное питание, когда механизмы адаптации на всех уровнях организации должны обеспечить полную индивидуальную приспособленность к комплексу факторов внешней среды. Успешное прохождение этих периодов развития связано с продолжением начатого на стадии «средней – поздней бластулы» синтеза и-РНК на зародышевых генах. Следует отметить, что отход на стадии перед вылуплением, как правило, незначителен. Вероятно, это свидетельствует о том, что на момент выхода из яйцевых оболочек организм достигает требуемого уровня адаптации и приспособленности [10].

Материалы и методы

Объектами наших исследований являлись чистые виды и гибриды первого поколения плотвы и леща на ранних этапах развития. За весенне-летний период проведена постановка 4-х серий экспериментов (в 3-х повторностях каждая) по индивидуальному скрещиванию леща и плотвы. Из естественных водоемов отбирали половозрелые экземпляры и проводили оплодотворение сухим способом по стандартной рыбоводной методике [11]. Оплодотворенную и развивающуюся икру инкубировали при температуре, максимально приближенной к температуре природного водоема. На протяжении эмбриогенеза наблюдение за развитием и отбор проб проводился на следующих стадиях: образование перивителлинового пространства и бластодиска, дробление, бластула, окончание гастрюляции, начало сегментации (3-5 сегментов), разгар сегментации (18-23 сегмента), окончание сегментации, выклев, после выклева (этап «свободного» эмбриона), этап смешанного питания, этап экзогенного питания. При определении стадий развития мы руководствовались соответствующими литературными источниками [18, 19]. Фиксацию проб производили следующим образом: пробы зародышей в индивидуальном порядке помещали в лунки центрифужного стаканчика, растирали стеклянной палочкой до однородной массы, заливали 70-ю мкл 20% сахарозы и замораживали. Перед электрофоретической обработкой, для получения белкового супернатанта, центрифужные стаканчики с пробами размораживали и помещали в центрифугу (ротор угловой РУ 6х10, максималь-

ная рабочая величина частоты вращения 18000 оборотов/мин, максимальная величина фактора разделения 29000), центрифугировали в течение 20 минут при 18000 оборотах и температуре -4°C .

По каждой из обозначенных стадий раннего развития чистых видов и гибридов первого поколения исследована активность следующих изоферментов различных биохимических классов: лактатдегидрогеназы (LDH), супероксиддисмутазы (SOD), малик-энзима (ME), бэтта-нафтилзависимая эстеразы (β -EST), аспартатаминотрансферазы (AAT). Верификация полученных результатов проводилась отдельно на неоплодотворенной икре, мышечных пробах сеголеток и половозрелых производителей. Описание времени проявления активности ферментов имеет отношение только к ферментным локусам зародыша, но не желтка.

В ходе работы использовали метод диск-электрофореза в 6% ПААГ [13]. При выявлении активности ферментов на электрофореграммах использованы стандартные гистохимические методики [13, 14].

Результаты исследования

Нормальное протекание морфогенетических процессов имеет в своей основе метаболическое обеспечение, подразумевающее согласованную работу всех звеньев промежуточного обмена клеток зародыша. После оплодотворения, на самых ранних этапах развития зародыша, его метаболизм обеспечен в основном белками и ферментами, загруженными в оогенезе матери. Начиная со стадии поздней бластулы, в зародыше растет доля белков, синтезированных под контролем его генотипа.

Субстратспецифическая активность исследуемых ферментов выявлялась в двух основных зонах электрофоретической подвижности: в зоне подвижности основного желточного белка – липовителлина и в зоне подвижности самого фермента. Методом микропрепарирования удалось разделить икринки на оболочку, желток и собственно зародыш.

Субстратспецифическая активность во фракции желточного белка липовителлина была обнаружена нами по LDH, ME и β -EST. По мере расхождения зародышем запасов липовителлина, активность по данным изозимам угасала. В оболочке активности всех исследуемых ферментов не обнаружено. Во фракции зародыша в раннем развитии чистых видов и гибридов F_1 нами выявлены различия по времени проявления активности в соответствующей зоне электрофоре-

тической подвижности изоферментов LDH, SOD, ME, β -EST и AAT (рис. 1). Так, установлено, что по времени экспрессии LDH, SOD и β -EST опережают другие ферменты. Их активность наблюдается на всем протяжении эмбрионального развития во всех исследуемых группах рыб. ME и AAT экспрессировались значительно позднее.

Момент активации аспаратаминотрансферазы приходился на стадии начала и массового вылупления эмбрионов из яйцевых оболочек. Экспрессия малик-энзима наблюдалась после выклева – с этапа «свободного» эмбриона [15]. Ранняя экспрессия обычно характерна для ферментов основных звеньев внутриклеточного метаболизма и, следовательно, опережающая активность LDH, SOD и β -EST закономерна и свя-

зана с метаболическим обеспечением зародыша на ранних этапах развития.

Лактатдегидрогеназа, супероксиддисмутаза и β -эстераза относятся к так называемым хаус-киппинг-ферментам широкого распространения, которые присутствуют во всех тканях и органах как развивающегося, так и взрослого организма [1, 4]. LDH является одним из ферментов реакций гликолиза, играющего значительную роль в энергообеспечении клетки. Супероксиддисмутаза участвует в защите клетки от действия свободных супероксидных радикалов. С помощью эстераз уже на самых ранних этапах развития осуществляется расщепление желточных липидов – основного «энергетического депо» зародыша.

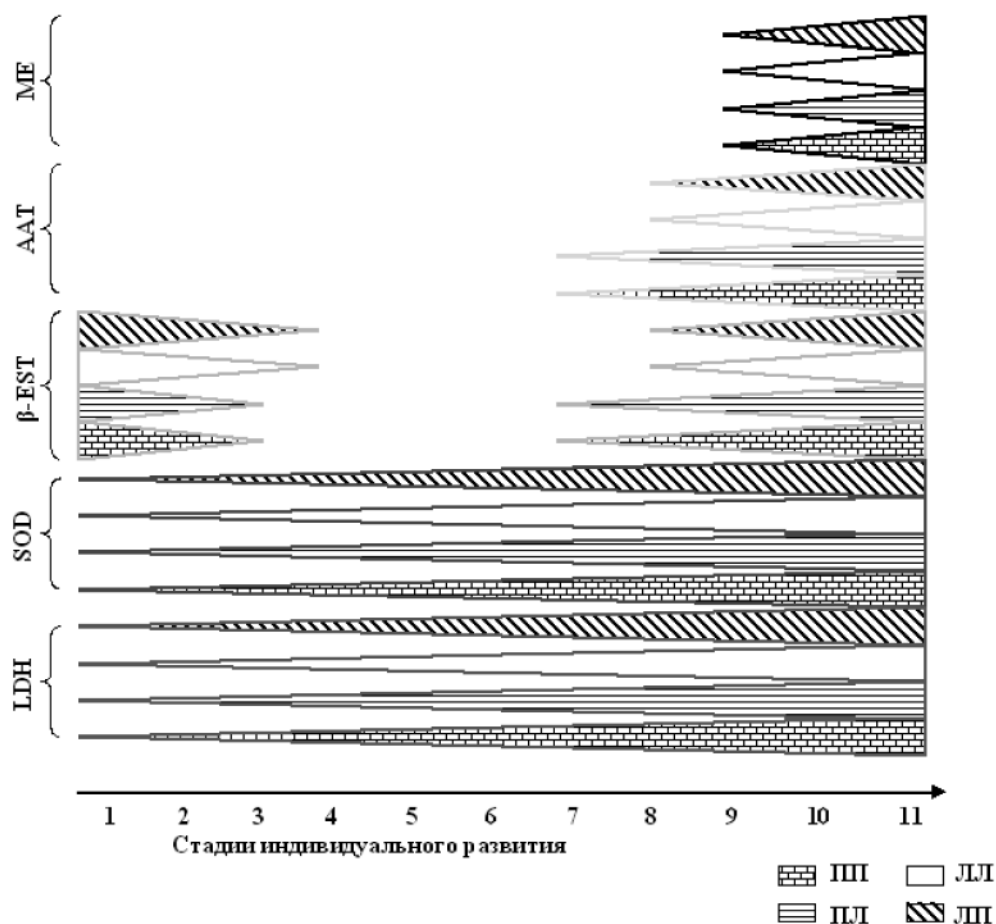


Рисунок 1 – Временная шкала проявления активности ферментов различных биохимических классов у леща, плотвы и их реципрокных гибридов F₁. Стадии развития: 1 – образование перивителлинового пространства и бластодиска; 2 – дробление; 3 – бластула; 4 – окончание гастрюляции; 5 – начало сегментации (3-5 сегментов); 6 – разгар сегментации (18-23 сегмента); 7 – окончание сегментации; 8 – выклев; 9 – после выклева, этап «свободного» эмбриона; 10 – этап смешанного питания; 11 – этап экзогенного питания

Активность аспаратаминотрансферазы не выявлена на ранних стадиях, вероятно, по причине недостаточного количества аминокислот, находящихся в желточном мешке и необходимых для развития зародыша. По исчерпанию этого запаса запускаются реакции переаминирования, катализируемые этим ферментом. Реакции, катализируемые малик-энзимом, снабжают развивающийся зародыш восстановительным эквивалентом НАДФН, необходимым для синтеза жирных кислот. Мы полагаем, что отсутствие в зародыше довольно длительное время активности малик-энзима скомпенсировано его наличием в желтке (во фракции липовителлина).

Нормальный ход раннего развития зародыша определяется достижением сбалансированности процессов морфогенеза и метаболизма [5,6]. В основе метаболизма лежат процессы дифференциальной экспрессии генов, активация которых определяется метаболической средой организма. Существование таких взаимосвязей предполагает контроль раннего развития разными по происхождению регуляторами (активаторами) – материнскими и зародышевыми. Ряд исследователей придерживается точки зрения о независимой регуляции материнских и отцовских аллелей, другие предполагают главенствующую роль материнских активаторов в эмбриональном развитии гибридов [16]. Рассматривая обе точки зрения, мы считаем, что в процессе развития имеет место смена материнских регуляторов на

собственные зародыша. Необходимо отметить, что регуляторные механизмы, контролирующие функции растущего организма, с одной стороны, воздействуют на гетерогенный ядерный материал клеток зародыша, а с другой стороны, – сами поставлены в условия меняющейся метаболической среды, так как происходит постепенная замена материнской среды, состоящей в основном из белков желтка, на белки, синтезированные под контролем самого зародыша.

Выводы

Экспериментально полученные данные по времени проявления активности ферментов различных биохимических классов в раннем развитии чистых видов плотвы, леца и гибридов F₁ позволили нам установить, что:

– экспрессия по лактатдегидрогеназе (LDH), супероксиддисмутазе (SOD) и бета-эстеразе (β-EST) на ранних этапах развития связана с метаболическим обеспечением зародыша и обусловлена действием материнских активаторов, синтезированных в оогенезе, на материнские по происхождению гены зародыша;

– экспрессия по аспаратаминотрансферазе (AAT) и малик-энзиму (ME) на поздних этапах развития напрямую связана с полным исчерпанием эндогенных ресурсов, запасенных в оогенезе (белки желтка), на белки, синтезированные под совместным контролем отцовских и материнских по происхождению генов зародыша.

Литература

1. Крыжановский, С.Г. Закономерности развития гибридов рыб различных систематических категорий [Текст] / С.Г. Крыжановский. – М.: Наука, 1968. – 220 с.
2. Кирпичников, В.С. Генетика и селекция рыб [Текст] / В.С. Кирпичников. – Л.: Наука, 1987. – 520 с.
3. Слынько, Ю.В. Система размножения межродовых гибридов плотвы (*Rutilus rutilus* L.), леца (*Abramis brama* L.) и синца (*Abramis ballerus* L.) (LEUCISCINAE: CYPRINIDAE) [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.10: защищена май 2000 г.: утв. 02.06.2000 / Слынько Юрий Владиславович. – СПб., 2000. – 186 с.
4. Корочкин, Л.И. Введение в генетику развития [Текст] / Л.И. Корочкин. – М.: Наука, 1999. – 253 с.
5. Хочачка, П. Стратегия биохимической адаптации [Текст] / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1977. – 384 с.
6. Новиков, Г.Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе [Текст] / Г.Г. Новиков. – М.: Эдиториал УРСС, 2000. – 279 с.
7. Чадов, Б.Ф. Поведение хромосом в митозе и мейозе и хромоцентральная организация ядра у *Drosophila melanogaster* [Текст] / Б.Ф. Чадов // Молекулярные основы генетических процессов. – М.: Наука, 1981. – С. 463-474.
8. Petit, C. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species [Text] / C. Petit, F. Bretagnolle, F. Felber // Elsevier Science. – 1999. – V. 14. – № 8. – P. 306-311.
9. Hewitt, M.G. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing in space and time [Text] / M.G. Hewitt // Molec. Ecol. – 2001. – V.10. – P. 537-549.
10. Рябов, И.Н. Методы гибридизации рыб на примере семейства карповых [Текст] / И.Н. Рябов // Исследование размножения и развития рыб. – М.: Наука, 1981. – С. 195-215.

11. Крыжановский, С.Г. Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб (Cyprinoidei и Siluroidei) [Текст] / С.Г. Крыжановский // Тр. Ин-та морфол. живот. им. А.Н. Северцова АН СССР. – Москва, 1949. – Вып. 1. – С. 3-332.

12. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул [Текст] / Э. Гааль, Г. Медьеш, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 448 с.

13. Лойда, З. Гистохимия ферментов (лабораторные методы) [Текст] / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. – М.: Мир, 1982. – 272 с.

14. Лапушкина, Е.Е. Эколого-генетический анализ раннего развития отдаленных гибридов F1 леща (*Abramis brama* L.), плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и синца (*Abramis ballerus* L.) [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16: защищена 26.12.2002: утв. 16.08.2003 / Лапушкина Елена Евгеньевна. – Борок, 2002. – 145 с.

15. Parker, H.R. Developmental patterns of gene expression in genetically different strains of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [Text] / H.R. Parker, D.P. Philipp, G.S. Whitt // Isoz. Bull. – 1982. – V. 15. – P. 115-116.

16. Gavaia, P.J. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood [Text] / P.J. Gavaia, D.C. Simes, J.B. Ortiz-Delgado et al. // Gene Expression Patterns. – 2006. – V. 6 (6). – P. 637-652.

References

1. Kryzhanovskij, S.G. Zakonomernosti razvitija gibridov ryb razlichnyh sistematiceskikh kategorij [Tekst] / S.G. Kryzhanovskij. – M.: Nauka, 1968. – 220 s.

2. Kirpichnikov, V.S. Genetika i selekcija ryb [Tekst] / V.S. Kirpichnikov. – L.: Nauka, 1987. – 520 s.

3. Slyn'ko, Ju.V. Sistema razmnozhenija mezhrodovyh gibridov plotvy (*Rutilus rutilus* L.), leshha (*Abramis brama* L.) i sinca (*Abramis ballerus* L.) (LEUCISCINAE: CYPRINIDAE) [Tekst]: dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.10: zashishhena maj 2000 g.: utv. 02.06.2000 / Slyn'ko Jurij Vladislavovich. – SPb., 2000. – 186 s.

4. Korochkin, L.I. Vvedenie v genetiku razvitija [Tekst] / L.I. Korochkin. – M.: Nauka, 1999. – 253 s.

5. Hochachka, P. Strategija biohimicheskoj adaptacii [Tekst] / P. Hochachka, Dzh. Somero. – M.: Mir, 1977. – 384 s.

6. Novikov, G.G. Rost i jenergetika razvitija kostistyh ryb v rannem ontogeneze [Tekst] / G.G. Novikov. – M.: Jeditorial URSS, 2000. – 279 s.

7. Chadov, B.F. Povedenie hromosom v mitoze i mejoze i hromocentral'naja organizacija jadra u Drosophila melanogaster [Tekst] / B.F. Chadov // Molekuljarnye osnovy geneticheskikh processov. – M.: Nauka, 1981. – S. 463-474.

8. Petit, C. Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species [Text] / C. Petit, F. Bretagnolle, F. Felber // Elsevier Science. – 1999. – V. 14. – № 8. – P. 306-311.

9. Hewitt, M.G. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing in space and time [Text] / M.G. Hewitt // Molec. Ecol. – 2001. – V.10. – P. 537-549.

10. Rjabov, I.N. Metody gibridizacii ryb na primere semejstva karpovyh [Tekst] / I.N. Rjabov // Issledovanie razmnozhenija i razvitija ryb. – M.: Nauka, 1981. – S. 195-215.

11. Kryzhanovskij, S.G. Jekologo-morfologicheskie zakonomernosti razvitija karpovyh, v'junovyh i somovyh ryb (Cyprinoidei i Siluroidei) [Tekst] / S.G. Kryzhanovskij // Tr. In-ta morfol. zhivot. im. A.N. Severcova AN SSSR. – Moskva, 1949. – Vyp. 1. – S. 3-332.

12. Gaal', Je. Elektroforez v razdelenii biologicheskikh makromolekul [Tekst] / Je. Gaal', G. Med'eshi, L. Vereckeji. – M.: Mir, 1982. – 448 s.

13. Lojda, Z. Gistohimija fermentov (laboratornye metody) [Tekst] / Z. Lojda, R. Gossrau, T. Shibler. – M.: Mir, 1982. – 272 s.

14. Lapushkina, E.E. Jekologo-geneticheskij analiz rannego razvitija otdalennyh gibridov F1 leshha (*Abramis brama* L.), plotvy (*Rutilus rutilus* L.) i sinca (*Abramis ballerus* L.) [Tekst]: dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.16: zashishhena 26.12.2002: utv. 16.08.2003 / Lapushkina Elena Evgen'evna. – Bорок, 2002. – 145 s.

15. Parker, H.R. Developmental patterns of gene expression in genetically different strains of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [Text] / H.R. Parker, D.P. Philipp, G.S. Whitt // Isoz. Bull. – 1982. – V. 15. – P. 115-116.

16. Gavaia, P.J. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood [Text] / P.J. Gavaia, D.C. Simes, J.B. Ortiz-Delgado et al. // Gene Expression Patterns. – 2006. – V. 6 (6). – P. 637-652.