

DOI <https://doi.org/10.36059/978-966-397-240-4-18>

Грициняк І. І.

*доктор сільськогосподарських наук, професор, академік
Національної академії аграрних наук України, директор
Інститут рибного господарства
Національної академії аграрних наук України
м. Київ*

Маріуца А. Е.

*кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник,
завідувачка відділу молекулярно-генетичних досліджень
Інститут рибного господарства
Національної академії аграрних наук України
м. Київ*

Борисенко Н. О.

*кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник відділу
молекулярно-генетичних досліджень
Інститут рибного господарства
Національної академії аграрних наук України
м. Київ*

Тушницька Н. Й.

*кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник,
учений секретар
Інститут рибного господарства
Національної академії аграрних наук України
м. Київ*

**ЗАСТОСУВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ
У РИБНИЦТВІ**

Анотація. Проведені молекулярно – генетичні дослідження коропових видів риб з різних зон відтворення характеризуються специфічними особливостями їх генетичної структури. Виявлення і аналіз поліморфних білкових систем риб є важливим для вирішення

багатьох теоретичних і практичних проблем, пов'язаних з раціональною організацією рибного господарства і селекцією риб. Характеристика генетичної структури породних груп риб з використанням методів біохімічної генетики дозволяє оцінювати особливості їх походження, визначати ступінь їх генетичної подібності, а також вивчення специфічних особливостей динаміки генофондів у відповідь на дію факторів штучного і природного відборів. ISSR-аналіз дозволив вивчити генетичну мінливість коропових видів риб на популяційному рівні. Виявлені в ході даної роботи специфічні «популяційні» поліморфні ISSR-маркери дозволяють використовувати отримані дані в подальших дослідженнях з розробки генетичної паспортизації з використанням існуючих сучасних методик. Оптимізований ISSR-метод може служити ефективним інструментом для подальших генетичних досліджень. Одержані результати, дозволяють контролювати селекційно-племінну роботу в процесі відтворення генофонду наявних популяцій риб. Для підвищення ефективності селекційно-племінної роботи у рибництві доцільно використовувати генетичні маркери які мають високу специфічність до окремих фрагментів ДНК риб.

Вступ

Популяційно-генетичні дослідження у галузі сучасного рибництва набувають пріоритетного значення в процесі ведення племінної роботи в господарствах. Молекулярно-генетичні маркери відіграють провідну роль у сучасних дослідженнях, реально допомагаючи вирішувати багато важливих актуальних як теоретичних, так і практичних проблем селекції та генетики.

На даний час молекулярні методи які використовуються для популяційних досліджень риб, класифікують на два типи маркерів – білки та ДНК. У популяційно-генетичних дослідженнях використовують три основні класи генетичних маркерів: генетико-біохімічні, мітохондріальна та ядерна ДНК [1; 2]. Ізоферменти, як генотипові маркери, відіграють важливу роль в контролі перенесення генетичного матеріалу. Будь-які маніпуляції з генетичним матеріалом, потребують контролю ефективності інтродукції генетичного матеріалу, для чого з високою ефективністю застосовуються різні ізоферменти [3–5]. Біохімічні маркери дозволяють вивчати генетичну структуру популяцій і стад риб, стежити за її змінами в процесі експлуатації цих стад, доместикації нових видів, а також у процесі селекції. Таким чином, характеристика популяцій

та стад риб, отримана методами біохімічної генетики, дозволяє виявити шляхи їх походження, визначити ступінь їх генетичної подібності, а також відкриває перспективи вивчення генетичних змін в процесі доместикації, розведення та селекції.

Актуальними є простота розшифровки отриманих електрофоретичних продуктів (використання локусів, продукти яких – білки – мономери або димери) та невисока вартість робіт (дешевизна реактивів і можливість отримати одночасно електрофоретичні спектри продуктів декількох локусів) [6–9].

У сучасних дослідженнях генетичної структури здебільшого використовують підходи ідентифікації поліморфізму на рівні ДНК [10–12]. В процесі ведення селекційно-плеємної роботи в рибництві для встановлення особливостей генетичної структури груп риб все частіше використовують високополіморфні молекулярно-генетичні маркерні системи на підставі ПЛР [13]. Популярність цих методів зумовлена, насамперед, можливістю проведення адекватного оцінювання як між-, так і внутрішньопопуляційної мінливості досліджуваних тварин. Саме застосування у дослідженнях значної кількості маркерів, за жорсткого відбору особин з унікальним поєднанням ознак – є основним шляхом для вивчення можливих взаємозв'язків між різними морфофізіологічними системами на рівні ДНК [14; 15]. Одним із методів, який дозволяє в певній мірі провести аналіз генетичної структури, оцінку генетичної різноманітності популяцій, ступеня їхньої інбредності та генетичних відстаней між лініями, породами і популяціями риб, а також філогенетичних взаємовідносин між ними, є метод за використання ISSR-PCR-аналізу [16; 17]. За допомогою такого підходу можна ампліфікувати фрагменти ДНК, що знаходяться між двома близько розташованими послідовностями, які вважаються унікальними. Враховуючи те, що ISSR-метод має високу відтворюваність, його можна з успіхом застосовувати для виявлення внутрішньовидової генетичної мінливості та ідентифікації популяцій чи ліній [17].

1. Поліморфізм окремих генетико-біохімічних систем у коропових видів риб

Селекційно-плеємна справа у коропівництві охоплює питання закріплення генетичного потенціалу існуючих порід внутрішньопородних типів українських коропів та моніторинг накопичення змін і специфіки генетичної структури виду, збереження генофонду

рідкісних і малопоширених масивів коропа, створення нових типів високоспинних малолускатих коропів з поліпшеними господарськими характеристиками, в тім числі з використанням генетичних ресурсів зарубіжної селекції [18].

Одним з ефективних селекційних підходів сьогодення вважаються методики, результатом яких є інформація про генетичну структуру популяції. За використання методів біохімічної генетики стала реальною можливість кількісної оцінки електрофоретичної рухливості білків. Найвагомим аспектом таких підходів є відповідність гену, що кодує даний білок, та його продукт, який може бути ідентифікований електрофоретичним шляхом, тобто – відповідність фенотипу і генотипу. На основі принципу близькості гену і ознаки базуються головні генетичні положення популяційної динаміки, які дозволяють вирішувати численні практичні питання вітчизняного рибництва [6].

Метою даної роботи було проведення порівняльного аналізу генетичної структури українських лускатих і рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу на основі аналізу розподілу частот алелів і генотипів за окремими поліморфними генетико-біохімічними системами. В результаті порівняльного аналізу генетичної структури популяції українських лускатих і рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького внутріпорідного типу за окремими генетико-біохімічними системи плазми та еритроцитів, виявлено відмінності між лускатими і рамчастими коропами. Були досліджені наступні генетико-біохімічні системи

Церулоплазмін (CP) – білок плазми крові, з оксидазною активністю, кодується одним структурним геном та є монолокусною системою. Вперше виявлений і виділений шведськими вченими К. Хольмбергом і К. Лаурелем в 1948 р. З рівнем церулоплазміну в крові пов'язаний обмін міді в організмі, так як швидкість синтезу цього білка регулюється відповідно з вмістом міді в печінці і виділенням її з організму [9].

Амілаза (AM) (від лат. Amylum – крохмаль), ферменти класу гідролаз, що каталізують гідроліз крохмалю, глікогену і ін. споріднених оліго- і полісахаридів, головним чином по 1,4- α -глюкозидному зв'язку. Амілаза кодується декількома структурними генами [9]. Церулоплазмін та амілаза типуються одночасно, так як електрофорез цих білків проводиться в одних и тих же буферних системах. В наших дослідженнях ці системи виявились мономорфними.

Гемоглобін (НВ) – білок, який кодується одним структурним геном. Кожна молекула гемоглобіну складається із чотирьох субодиниць, згрупованих по дві. Різні субодиниці кодуються різними генами. На даний час гемоглобін вивчено у більшості савців та риб. Генетичний поліморфізм гемоглобіну у риб, як і у багатьох савців, обмежений. Це, можливо, пов'язано з точною структурою молекул гемоглобіну, яка прив'язана до виконання своїх функцій. Рухливість гемоглобіну у риб значно нижча ніж у савців. Фореграми гемоглобінів видоспецифічні [9]. В цілому можна вважати гемоглобін у коропових значно менш мінливим ніж інші системи. В наших дослідженнях поліморфізму за локусом гемоглобіну не виявлено.

Пуриннуклеозидфосфорилаза (PN) – фермент, який каталізує зворотній процес фосфорилази пуринових нуклеозидів із утворенням пуринових основ і фосфорильованих сахарів (рибози і дезоксирибози) [9]. В наших дослідженнях поліморфізму за даним локусом не виявлено.

Трансферин (TF) – білок фракції β -глобулінів плазми крові, основною функцією якого є транспорт заліза в організмі від кишечника до місць синтезу гемоглобіну та депо заліза. В геномі всіх видів риб трансферин представлений одним локусом, що пояснюється високою стабільністю його основної функції [4]. Успадкування кодомінантне. В більшості видів риб [4; 9] локус трансферину поліморфний. Число алелей становить від 2 до 13 (в середньому 3–4). Таке алельне різноманіття деякі автори пов'язують із виконанням ним вторинних бактерицидних функцій. Трансферин відносять до групи білків з найбільш вираженим поліморфізмом. В наших дослідженнях у лускатих та рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу виявлено п'ять алельних варіантів за локусом трансферину: Tf A, Tf B, Tf C₁, Tf C₂, Tf D. Аналіз генотипів трансферину показав, що із 15-ти можливих комбінацій наявні лише 12, серед яких домінував генотип C₁C₁. Характерною особливістю досліджених популяцій була відсутність алельного варіанту трансферину B у рамчастих коропів. Суттєво меншу частоту мали алелі Tf A (0,231 у лускатих і 0,265 у рамчастих), Tf D (0,038 у лускатих і 0,147 у рамчастих). З найбільшою частотою траплявся алель Tf C₁ (0,462 у лускатих і 0,412 у рамчастих), що підтверджується попередніми дослідженнями генетичної структури також і у коропів любінського внутрішньопорідного типу, які мали подібну картину розподілу алелів за локусом TF [19; 20].

Альбуміни (ALB), найбільша фракція білків плазми крові, забезпечують підтримання колоїдно-осмотичного тиску внутрішнього середовища організму, транспорт жирних кислот, вітамінів, амінокислот та інших продуктів життєдіяльності організму риби. У риб за допомогою електрофоретичного розділення білків плазми крові в поліакриламідному гелі виявлено більшу кількість фракцій альбумінів ніж у ссавців. Альбумінам риб притаманна видова специфічність у фракційному складі [4; 6]. Система альбумінів в переважній більшості риб поліморфна [4], число алелів становить від 2 до 5.. В досліджених групах лускатого і рамчастого коропів альбумін представлений двома алельними варіантами – А і В. У рамчастих корпів частота алеля с високою рухливістю Alb A була невисокою і склала 0,441, в порівнянні з повільним Alb B (0,559). В лускатих коропів частота алеля з низькою рухливістю Alb B була невисокою (0,346) в порівнянні з алельним варіантом Alb A (0,654).

Гідролаза карбоксильних ефірів (естераза, EST) (КФ 3.1.1.1) – фермент, що каталізує реакції гідролізу ефірів карбонових кислот з утворенням відповідних спиртів та карбоксилатів. У амурського сазана та коропових риб виявлено декілька локусів цього ферменту. За локусом Est-1, у коропових риб виявлено два алелі: швидкий – F і повільний – S. Поліморфізм за локусами естераз притаманний багатьом видам риб [4].

Розподіл повільного і швидкого алельних варіантів (F, S) за локусом EST був у рівноваженому стані, тобто у лускатих і рамчастих коропів вони траплялися з наближеною частотою F (0,538 і відповідно 0,529) S (у лускатих 0,462 і відповідно у рамчастих 0,471).

Співвідношення частот алелів TF в популяціях риб зазвичай добре вкладається в рамки закону Харді – Вайнберга, але бувають і відхилення – в окремих вибірках не вистачає гетерозигот, рідше спостерігається їх надлишок. У проведених дослідженнях локус з TF як у рамчастих так і у лускатих має врівноважений стан, тобто співвідношення виявлених генотипів близьке до очікуваного. За іншими генетико – біохімічними системами EST, ALB у обох досліджених груп коропів спостерігався невірноважений стан через достовірний надлишок гетерозигот, що може свідчити про певні процеси генетичної консолідації даних популяцій.

Важливим параметром при оцінці динаміки генетичного стану популяції є гетерозиготність (H). Різні типи відбору, дрейф генів, мутаційний процес, та інші фактори популяційної динаміки часто

впливають на гетерозиготність популяції, тому її оцінка є необхідною умовою в популяційних дослідженнях [5]. Частота гетерозигот є важливим показником, так як кожна гетерозиготна особина несе різні алелі і тим ілюструє наявність мінливості. Рівень гетерозиготності виявився дещо вищим від очікуваного у лускатих та рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу за локусами естерази та альбуміну. З усіх досліджуваних генетико – біохімічних систем найвищий рівень гетерозиготності спостерігався за локусом EST (0.941) у рамчастих коропів. Найменша гетерозиготність виявилася у лускатих коропів за локусом ALB (0.692).

Середня гетерозиготність за всіма досліджуваними локусами була вищою від очікуваного: у рамчастих коропів вона становила 0.882 ± 0.044 , проти очікуваного 0.583 ± 0.025 у лускатих коропів фактична величина значення гетерозиготності була на рівні 0.743 ± 0.032 проти очікуваного 0.570 ± 0.018 . Встановлено, що на міжпопуляційну мінливість у рамчастого коропа припадає 20,8 % від виявленої генетичної мінливості, а у лускатого 13,8 % на основі розрахунку коефіцієнтів інбридингу Райта [4; 5].

При використанні генетико-біохімічних систем виявлено породоспецифічні особливості будови генетичної структури лускатих і рамчастих коропів антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу. Спостерігається певна генетична диференціація за окремими генетико – біохімічними системами та перевага фактичного рівня середньої гетерозиготності за всіма локусами від очікуваного рівня середньої гетерозиготності у досліджених коропів. За досліджуваними генетико-біохімічними системами вивлено поліморфізм за локусами TF, ALB, EST, а такі системи як CP, AM, PN, NB представлені мономорфними локусами. За локусом трансферину найбільшою частотою траплявся алельний варіант TF C₁, що є притаманним для українських порід коропів, а співвідношення фактично виявлених генотипів за локусом трансферину наближається до теоретично розрахованого у коропів рамчастої та лускатої порід. За локусами EST, ALB у обох досліджених груп коропів спостерігався невідножаний стан через достовірний надлишок гетерозигот, що може свідчити про певні процеси генетичної консолідації даних популяцій. Таким чином, обрані генетико-біохімічні системи, в поєднанні з фенотиповими ознаками дадуть змогу, в подальшому, оцінити рівень генетичної мінливості, генотиповий склад, ступінь

внутрішньо- і міжпопуляційної диференціації, які є обов'язковими при проведенні селекційно-племінної роботи в коропівництві.

Селекційно-племінна робота з товстолобиком у рибицтві охоплює питання закріплення генетичного потенціалу, збереження генофонду білого та строкатого товстолобиків, формування гетерогенного племінного матеріалу для потреб промислової гібридизації. Тому необхідно: вивчити генетичну структуру наявного племінного матеріалу різного генезису, проводити стабілізацію основних показників продуктивності, виділити нові більш продуктивні господарсько-цінні генотипи, сформувати та впровадити у виробництво високопродуктивні стада. Також необхідно створити всі умови для збереження генетичної чистоти і збереження від фізичного знищення існуючого генофонду українських популяцій товстолобика. Значна частина мінливості, що спостерігається, як правило, обумовлена генетичними причинами, інша – впливом середовища. В зв'язку з цим залежність між фенотипом і генотипом не є однозначною і чіткою, тому не завжди можна пояснити причини мінливості. Незважаючи на велику кількість методів, які дозволяють маркірувати мінливість генетичного матеріалу, до цього часу найбільш доступним, інформативним та надійним залишається метод аналізу генетично детермінованого поліморфізму білків з відомою біохімічною функцією [3; 4; 8; 17]. Тому аналіз білкового поліморфізму має велике значення для контролю за генетичною структурою природних популяцій та селекційних стад. В селекційних роботах аналіз за поліморфними генами дозволяє визначити ступінь генетичних відмінностей між різними племінними групами, підтримувати необхідний рівень гетерозиготності та попереджувати інбридинг [3; 4; 7; 8; 17].

З метою вивчення особливостей генетичної структури популяцій білого та строкатого товстолобиків проведено аналіз розподілу алелів і генотипів за електрофоретичними варіантами окремих генетико-біохімічних систем. Виконано аналіз генетичних структур двох видів: білого та строкатого товстолобиків українських популяцій. Проведено дослідження за поліморфними генетико-біохімічними системами: трансферину TF, преальбуміну Pralb, естерази EST, [21].

Преальбумін Pralb – білок, що синтезується в печінці; основною функцією його є транспортування тиреоїдних гормонів – тироксину і трийодтироніну [9].

Преальбумін Pralb згідно з проведеним аналізом генетичної структури білого та строкатого товстолоба представлений трьома електрофоретичними варіантами – AA, AB та BB.

При електрофоретичному аналізі плазми крові виявлено дві зони естеразної активності – швидка Est-F та повільна Est-S. Локус Est – поліморфний і представлений трьома генотипами – FF, FS і SS. У досліджених груп виявили по два алельні варіанти F (швидкий) та S (повільний) за локусами Pralb. Локус TF у досліджуваних груп розподілявся на 2–5 електрофоретичних компоненти – Tf A, B, C, D, E. За розподілом алельних частот переважав швидкий електрофоретичний варіант за локусом EST. За локусом Pralb у групі строкатого товстолобика переважав алельний варіант зі швидкою рухливістю Pralb A (0,597), а у групі білого товстолобика варіант Pralb B (0,512).

Таким чином, результати досліджень дозволили визначити рівень поліморфізму окремих генетико-біохімічних систем у білого та строкатого товстолобиків. Використання генетико-біохімічних систем для досліджень генетичної структури популяції на даний час є найбільш інформативним і виправданим з точки зору реалізації мети. Хоча слід відмітити, використання генетико-біохімічних систем в якості маркерів продуктивних ознак потребує довготривалої планомірної селекційної роботи в напрямку пошуку корелятивних зв'язків в конкретному господарстві з стадами риб, а головне для цього необхідний чіткий селекційно-племінний облік у рибництві.

Зокрема, роботи з стадами білого та строкатого товстолобиків спрямовані на підвищення їх продуктивності, можуть бути реалізовані шляхом збільшення запасу мінливості популяції, необхідної для її розвитку і отримання генетичних ефектів при гібридизації. Гібридизація знаходить широке застосування в рибництві завдяки легкому схрещуванню риб в межах виду, використанню штучного осіменіння при заводському розведенні, а також значній плодючості риб, що дозволяє отримувати гібриди в масових кількостях з необхідними комбінаціями генів. Гібриди між білим та строкатим товстолобиком характеризуються більш широким спектром планктонного харчування, підвищеною життєстійкістю, кращими показниками вагового та лінійного росту, як наслідок і продуктивністю. Домогтися збільшення генетичної дивергенції породних груп товстолобика можна методом різноспрямованого добору особин з прижиттєвою оцінкою їх

генотипів за конкретними молекулярними маркерами. Це сприятиме ефективному відбору чистопородних плідників з метою подальшого їх використання при отриманні гібридних нащадків.

Наступним етапом досліджень було виконано аналіз генетичної структури білого (*Hypophthalmichthys molitrix*) і строкатого (*Aristichthys nobilis*) товстолобиків за окремими генетико-біохімічними маркерами – локусами трансферину TF, преальбуміну Pralb, естерази EST, КФ 3.1.1.1, який показав відмінності за частотою алелів.

У досліджуваних груп товстолобиків локус TF розподілявся на 2–4 компоненти, позначених у порядку зменшення електрофоретичної рухливості, як Tf A, B, C, D. У білого товстолобика виявлено чотири типи фракційного складу трансферину – один чотирьохкомпонентний (Tf ABCD), два трьохкомпонентні (Tf ABC, Tf BCD) і один двохкомпонентний (Tf BC). У строкатого товстолобика локус TF представлений 8-ма типами електрофоретичних фракцій – один чотирьохкомпонентний (Tf ABCD), три трьохкомпонентні (Tf ABC, Tf ABD, Tf BCD) і чотири двохкомпонентні (Tf AB, Tf AC, Tf BC, Tf BD).

У групі білого товстолобика особин з фенотипом Tf ABCD було 10 %, з Tf ABC – 10 %, Tf BCD – 30 % та 50 % особин з Tf BC. У строкатого товстолобика особини з фенотипом Tf ABCD становили 3 %, Tf ABC – 10 %, Tf ABD – 13 %, Tf BCD – 33 %, Tf AB – 7 %, Tf AC – 3 %, Tf BC – 27 %, Tf BD – 3 %.

Міжвидова відмінність визначається за локусом Pralb. У групі білого товстолобика переважає частота алельного варіанту Pralb B (низька електрофоретична рухливість) і становить 0,683, порівняно з частотою Pralb A – 0,317 (висока електрофоретична рухливість). В групі строкатого товстолобика частота обох алельних варіантів помітно не відрізняється і становить Pralb B – 0,467 та Pralb A – 0,533.

За розподілом фактичних і очікуваних генотипів виявлено міжвидові відмінності. У строкатого товстолобика достовірний надлишок гетерозигот присутній за локусами Pralb, EST ($P < 0,005–0,05$). З досліджених генетико-біохімічних маркерів досить високий рівень гетерозиготності присутній у строкатого за локусами Pralb, EST(73,3–79,3 %).

Таким чином, встановлені видові особливості генетичної структури популяцій товстолобиків. У групі строкатого товстолобика виявлена значна кількість досліджених генетико-біохімічних

систем представлена надлишком гетерозиготних особин, порівняно із групою білого товстолобика. Фактичний і очікуваний рівень середньої гетерозиготності на локус в обох видів помітно не відрізнявся і становив 60,4 % (очікуваний 50,1 %) у білого та 68,5 % (очікуваний 52,9 %) у строкатого товстолобиків. Рівень середньої гетерозиготності дає змогу говорити про значну гетерогенність досліджених стад, яка, в свою чергу, говорить про високий рівень генетичної мінливості різних видів товстолобика.

Промислова гібридизація коропа з амурським сазаном є одним з методів підвищення ефективності ставового рибництва. Перехід на гібридну форму розведення коропа з амурським сазаном дозволяє забезпечити в окремих господарствах стабільно високі показники як по виходу молоді з зимівлі, так і отримання товарної риби в період її нагулу. Завдяки підвищенню зимостійкості і наднормативного виходу гібридів з зимівлі господарства не тільки повністю забезпечують свої потреби в посадковому матеріалі, а й реалізують його надлишки іншим організаціям, що є економічно вигідним. Доцільність подальшого використання в промисловій гібридизації амурського сазана є обґрунтованою, насамперед у зв'язку із створенням коропо-сазанових гібридів для трьох-літнього циклу ведення ставового господарства в різних зонах рибництва [22].

Однак, для оцінки генетичної структури популяції, напрямку її динаміки, генетико – біохімічні маркери мають ряд переваг, зокрема: консерватизм алельних варіантів білків, знання їх біохімічних функцій та причин їх поліморфізму (амінокислотні заміни, що спричиняють зміну електрофоретичної рухливості). Оскільки відомі біохімічні функції досліджуваної генетико-біохімічної системи та порівняльний аналіз їх змін дає можливість робити висновки про те, які саме ланки загального метаболізму залучаються під час генетичної диференціації популяцій, зокрема сазана, в процесі його адаптації до умов навколишнього середовища при інтродукції на території України.

З метою вивчення генетичних особливостей будови генетичної структури амурського сазана проведено аналіз розподілу алелів і генотипів за електрофоретичними варіантами окремих генетико-біохімічних систем.

Виконано порівняльний аналіз генетичної структури двох груп риб: амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй» і ВАТ «Донрибкомбінат».

Результати власного дослідження виявили п'ять алевних форм за локусом трансферину: Tf A, Tf B, Tf C₁, Tf C₂, Tf D. Найбільш поширеними генотипами є ті, які складаються з алелів Tf C₁, Tf C₂. Порівняння фактичних і теоретично розрахованих частот генотипів виявило наявність незначного надлишку гетерозигот у досліджених популяціях.

У плідників плем'ядра ВАТ «Донрибкомбінат» (в подальшому популяція № 1) частота алеля Tf C₁ була найвищою і становила 0,400, тоді як у плідників плем'ядра ТзОВ «Карпатський водограй» (в подальшому популяція № 2) частота алеля Tf A також була зафіксована на досить високому рівні і становила 0,417. З найменшою частотою зустрічався алель Tf B 0,050. Деякі дослідники відмічають наявність у далекосхідного амурського сазана підвищеної концентрації Tf D (P = 0,640), тоді як для європейських популяцій сазана характерна його невисока частота [22; 23]. В досліджуваних нами популяціях, насиченість алелем Tf D становила в популяції № 1 p = 0,100, а у ВАТ «Карпатський водограй» спостерігали подібну його частоту p = 0,150.

Аналіз генотипів Tf (за п'ятьма алелями в сазанів у популяції № 1 і № 2) показав, що із 15-ти можливих комбінацій наявні лише 12, серед яких у плідників популяції № 1 домінував генотип C₁C₁ (P = 9), а в популяції № 2 – генотип AC₁ (P = 8). В популяції № 1 на відміну від іншої, були відсутні генотипи AA і BC₁, а в популяції № 2 були відсутніми генотипи BB, BC₂, B₁D. Аналіз відповідності фактичного розподілу генотипів трансферинового локусу у досліджених вибірках по відношенню до теоретично очікуваного за Гарді – Вайнбергом виявив, що фактична гетерозиготність в популяції № 1 (H_o = 0,5) була нижчою, тоді як у популяції № 2 (H_o = 0,9), навпаки, вищою від розрахованого значення. На результати популяційно-генетичних досліджень риб мають суттєвий вплив екологічні умови в яких вони мешкають, що призводить до суттєвих змін частот їх генотипів за локусами естераз. За локусом естерази в обох популяціях амурського сазана переважала частота Est S: що в популяції № 1 склала 0,733 і 0,550 в іншій. Із трьох теоретично можливих генотипів естерази в популяції № 1 був відсутній генотип FF. Для обох популяцій був характерним невірноважений стан, оскільки нами встановлений статистично значущий надлишок гетерозигот в обох досліджених популяціях (16 і відповідно в іншій 17) порівняно із теоретично розрахованим за формулою Гарді-Вайнберга.

За локусом альбуміну в сазана, як і в переважній більшості інших видів риб, виявлено два алеля А і В. Як і у випадку естерази, за даним локусом спостерігався надлишок гетерозигот (АВ). Серед досліджуваних популяцій рівень середньої гетерозиготності був підвищеним у популяції № 1 (0,590), що свідчить про високий розмах генетичної мінливості і потребує застосування селекційних заходів з підвищення генетичної консолідації стада.

Аналіз відповідності фактичного розподілу генотипів теоретичному значенню за Гарді- Вайнбергом показав генетично збалансований стан локусів Est і Alb.

Слід відмітити, що в малих популяціях можуть проявлятися негативні наслідки генетичного дрейфу, які супроводжуються фіксацією рецесивних алелів і зниженням загальногорівня мінливості.

На основі розрахунку коефіцієнтів інбридингу Райта [4; 5] встановлено, що на міжпопуляційну мінливість у амурського сазана припадає 36,9 % від виявленої генетичної мінливості

Між досліджуваними популяціями амурського сазана рівень генетичної диференціації був найвищим за локусом трансферину при загальному генетичному різноманітті 0,967. Цього потрібно було очікувати, виходячи із суттєвої різниці частот алелів між популяціями. Через значне відхилення значень частот алелів досліджуваних локусів від теоретично очікуваного розподілу за законом Гарді – Вайнберга, середнє значення коефіцієнту інбридингу особин відносно виду в цілому становило $FIS = 0,304$. Від'ємне середнє значення FIT , яке становить 0,098, пояснюється надлишком фактичних гетерозигот в обох популяціях за локусом естерази. Зростання частоти одних алелів і зниження частоти інших в популяції, на думку деяких авторів, можливе при проведенні штучного відбору за будь-якими рибогосподарськими ознаками і залежить від умов утримання риб [10].

В результаті порівняльного аналізу генетичної структури амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй» і ВАТ «Донриб-комбінат» за розподілом алельних варіантів генетико- біохімічних систем – TF, ALB, EST, встановлено, що для диференціації за умовами вирощування амурського сазана доцільно використовувати локуси TF, ALB, EST. Популяції амурського сазана характеризуються високим рівнем міжпопуляційної генетичної диференціації, особливо у відношенні локусу трансферину. Одержані результати дозволяють припускати, що оцінка генетичного поліморфізму риб

в аквакультури саме за обраними для дослідження системами може сприяти об'єктивному контролю ступеню інбридингу груп, а також змін їх генетичної структури в ряду поколінь і за різних умов розведення.

Від'ємне середнє значення FIS засвідчує значне відхилення фактичних частот генотипів від теоретично очікуваних за Гарді – Вайнбергом і є свідченням надлишку гетерозигот у риб досліджених популяцій.

2. Аналіз поліморфізму ДНК-маркерів (ISSR-PCR) у окремих корокових риб

На сьогодні ДНК-маркери активно використовуються у сучасній сільськогосподарській генетиці для вирішення низки теоретичних і практичних завдань: діагностики збудників інфекційних захворювань, вивчення генетичної мінливості, генетичної паспортизації та ін. [10; 23]. Аналіз унікальних послідовностей ДНК, за використання мікросателітних локусів дозволяє встановити генетичний поліморфізм на рівні геному, а не продуктів експресії генів. Використання ДНК-маркерів – один з перспективних напрямків дослідження геному, що дозволяє вирішувати не тільки фундаментальні, а й практичні завдання. Напрямок досліджень знайшов своє застосування при вивченні генофонду різних видів сільськогосподарських тварин і використання специфіки їхніх генотипів у селекційно-племінній роботі.

Одним з найбільш ефективних для виявлення та дослідження особливостей поліморфізму ДНК риб вважають метод ISSR-PCR аналізу. Результати, одержані за використання останніх, мають як важливе загально-біологічне значення, так і дозволяють контролювати селекційно-племінну роботу в процесі відтворення генофонду наявних популяцій риб. Для підвищення ефективності селекційно-племінної роботи у рибництві доцільно використовувати генетичні маркери які мають високу специфічність до окремих фрагментів ДНК риб [2; 7; 24].

ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) – суть методу полягає в ампліфікації ділянок ДНК, фланкованих мікросателітами [24]. Дані праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти ДНК, які перебувають між двома досить близько розташованими мікросателітними послідовностями [25; 26]. В результаті ампліфікації мультилокусні спектри, представлені на електрофореграммі, нараховують 10–60 смуг. До основних властивостей ISSR-маркерів

відноситься: відносно висока точність та поліпшена відтворюваність. Отримані ПЛР-продукти – видоспецифічні [25; 27]. Виявлення поліморфізму методом ISSR-PCR дозволяє встановити певну специфічність спектру ампліконів, в залежності від досліджуваного праймеру. Виявлені послідовності ДНК можуть бути частиною так званих геноспецифічних локусів, що, в свою чергу, відкриває перспективи для пошуку кореляцій з кількісними і якісними ознаками.

Протягом довгого часу селекційно-племінна робота у рибоводних господарствах ведеться без чітко спрямованої стратегії, селекція спрямована на різні напрямки використання даного виду з метою гібридизації. Отже, така різнопланова селекція накладає відбиток на генетичну структуру популяцій. Для виявлення відмінностей між популяціями користуються основними популяційно-генетичними характеристиками, такі як: частоти алелів, теоретично очікуваної та фактичної гетерозиготності, а також генетичні дистанції.

Породоспецифічні особливості генетичної структури українських лускатих коропів досліджували за використання ISSR-PCR-маркерів. У роботі використано праймери з тринуклеотидною короною частиною і якірною з одного нуклеотиду: (AGC)₆G, (ACC)₆G, (AGC)₆C. Сумарно під час дослідження коропів української лускатої породи в трьох господарствах виявили доволі високий рівень генетичного поліморфізму. Так, сумарна кількість ідентифікованих алельних варіантів з обраними праймерами склала 55: за використання праймера (AGC)₆G – 15 ампліконів, (ACC)₆G – 17 ампліконів, (AGC)₆C – 23 амплікони. Молекулярна маса на електрофореграмах коливалася в значних межах і була максимальною за використання праймера (ACC)₆G, (500–3500 п.н.) у нивківського лускатого коропа. За використання праймера (ACC)₆G молекулярна маса на електрофореграмах коливалася в значних межах (500–1700 п.н.) у лускатого коропа антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу. При використанні праймера (ACC)₆G молекулярна маса на електрофореграмах коливалася в значних межах (700–2000 п.н.) у коропів несвицького зонального типу. У групі нивківського лускатого коропа за використання праймера (AGC)₆G сумарно виявлено 35 ампліконів (7 алельних варіантів), розмір яких знаходився у межах 450–2500 п.н. Частота алельних варіантів довжиною 450 п.н. і 2500 п.н. становила 11,4 %. Частота алельних варіантів довжиною 500 п.н. та

2000 п.н. становила 5,7 %. За використання праймера (ACC)₆G у групі нивківського лускатого коропа сумарно виявлено 24 амплікони (9 алельних варіантів), розмір яких знаходився у межах 800–3500 п.н. Частота алельних варіантів довжиною 2000 п.н. і 3500 п.н. становила 4,17 %; 800 п.н., 1600 п.н., 2500 п.н. та 3000 п.н. – становила 8,3 %; 1300 п.н. та 1400 п.н. – 16,7 %. У групі нивківського лускатого коропа за використання праймера (AGC)₆C сумарно виявлено 43 амплікони (13 алельних варіантів), розмір яких знаходився у межах 300–2500 п.н. Індивідуальні спектри нараховували від одного до шести ампліконів. Частота алельних варіантів ампліконів довжиною 300 п.н., 450 п.н., 1000 п.н. і 2000 п.н. становила 9,3 %; 1500 п.н. та 2500 п.н. – 6,9 %; 550 п.н., 700 п.н. та 900 п.н. – 2,3 %; 400 п.н. та 750 п.н. – 11,7 %. За генетичними відстанями [28] є відмінності у досліджуваних груп українського лускатого коропа. Найнижчі значення генетичних відстаней виявлено у коропів несвицького зонального типу (0,109) відповідно до коропів нивківського внутрішньопорідного типу, найвищий індекс ідентичності у антонінсько-зозуленецького (0,325) відповідно до коропів несвицького зонального типу, тобто групи коропів розділилися за генетичним походженням.

За використання праймеру (AGC)₆G сумарно виявлено 35 ампліконів, індивідуальні спектри нараховували вісім алельних варіантів, розмір яких знаходився у межах 450–1500 п.н. Частота алельних варіантів довжиною 1500 п.н. і 1200 п.н. становила 11,4 %; 1000 п.н. та 800 п.н. – 17,1 %; 1400 п.н. та 500 п.н. – 14,3 %. За використання праймера (ACC)₆G у групі антонінсько-зозуленецьких коропів сумарно в спектрі виявлено 30 ампліконів, індивідуальні спектри нараховували вісім алельних варіантів. Частота алельних варіантів довжиною 1200 п.н. і 500 п.н. становила 16,7 %; 1700 п.н. й 800 п.н. – 10 %. За використання праймера (AGC)₆C у групі антонінсько-зозуленецьких коропів сумарно виявлено в спектрі 46 ампліконів, індивідуальні спектри нараховували чотирнадцять алельних варіантів. Частота алельних варіантів довжиною 1500 п.н., 900 п.н. та 600 п.н. становила 10,9 %; 1400 п.н., 800 п.н. та 550 п.н. 6,5 %; 1350 п.н., 400 п.н. і 200 п.н. – 4,3 %.

У групі несвицького внутріпорідного типу українського лускатого коропа за використання праймеру (AGC)₆G сумарно виявлено 41 амплікон, розмір яких знаходився у межах від 750 до 1500 п.н. Індивідуальні спектри нараховували одинадцять алельних варіантів. Частота алельних варіантів довжиною 1400 п.н.,

1300 п.н., 1000 п.н. та 800 п.н. становила 9,8 %; 1200 п.н., і 700 п.н. – 12,1 %. За використання праймеру (ACC)₆G у групі несвицького коропа індивідуально виявлено шістнадцять алейних варіантів. Сумарна кількість ампліконів в спектрі становила 49, розмір яких знаходився у межах від 700 до 2000 п.н. Частота алейних варіантів довжиною 2000 п.н., 1800 п.н. та 800 п.н. становила 8,16 %; 1600 п.н., 1400 п.н. та 1200 п.н. – 16,7 %. За використання праймеру (AGC)₆C у групі несвицького коропа індивідуально виявлено тринадцять алейних варіантів. Сумарна кількість ампліконів в спектрі становила 45, розмір яких перебував у межах від 450 до 2000 п.н. Частота алейних варіантів довжиною 2000 п.н., 1500 п.н. та 1000 п.н. становила 11,1 %; 1600 п.н. і 700 п.н. – 8,9 %.

Між генетичними відстанями досліджених груп коропа за праймером (AGC)₆C спостерігаються відмінності. Найвищі значення генетичних відстаней виявлено у антонінсько-зозуленецьких коропів (0,496) по відношенню до нивківських, найнижчий індекс ідентичності (0,214) серед досліджуваних груп виявлено у нивківського лускатого коропа відносно антонінсько-зозуленецького внутрішньопорідного типу, що залежить від генетичного походження коропів. На підставі індексу ідентичності побудовано дендрограму, яка дозволяє оцінити генетичну спорідненість досліджуваних груп коропів. Слід відзначити, що українські лускаті коропи різного походження розподілились за досліджуваними системами, утворюючи відповідні кластери. Кластерний аналіз, розрахунок якого ґрунтується на алейних частотах поліморфних локусів, дав змогу отримати два кластери – один сформували групи коропів нивківського внутрішньопорідного типу та несвицького зонального типу. Антонінсько-зозуленецький внутрішньопорідний тип коропа займає автономне положення на дендрограмі, що, як видно, свідчить про її специфічну генетичну структуру. На моделі порівняльного аналізу досліджуваних груп коропів чітко видно, що їх генетична структура за досліджуваними ISSR-маркерами залежить від генетичного походження риб.

Ефективне число алелей у досліджуваних популяціях генотипів варіює від 1,305 (AGC)₆C до 1,560 (AGC)₆G. Середнє ефективне число алелей на локус склало 1,402. За розрахунками алейних частот визначені основні показники генетичної мінливості. Максимальний сумарний рівень гетерозиготності зафіксований за локусом (AGC)₆C – 0,721, низький – за локусом (AGC)₆G – 0,641. Для нивківського лускатого коропа рівень очікуваної гетерозиготності за

ISSR-системою мав найвище значення показника за праймером (ACC)₆G – 0,811. Найнижчий рівень очікуваної гетерозиготності за праймером (AGC)₆G становив 0,557. Антонінсько-зозуленецький лускатий короп (0,763) та несвицький лускатий короп (0,765) за праймером (AGC)₆G займали проміжне значення даного показника.

Під час дослідження нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа, у роботі використано три праймери: (AGC)₆G, (ACC)₆G, (AGC)₆C та сумарно виявлено генетичний поліморфізм. Виявлено сумарно 128 ампліконів, кількість ідентифікованих алельних варіантів з обраними праймерами склала 29: за використання праймера (AGC)₆G – 10 ампліконів, (CTC)₆ C – 10 ампліконів, (GAG)₆C – 9 ампліконів.

Молекулярна маса на електрофореграмах коливалася в значних межах і була максимальною 900 п.н. – 3500 п.н., за використання приміру (CTC)₆ C, у нивківського рамчастого коропа. Частота алельних варіантів довжиною 2000 п.н., 3000 п.н., і 3500 п.н. становила 13,5 %. Частота алельних варіантів довжиною 1200 п.н. та 1300 п.н. становила 9,6 %. Очікувана гетерозиготність у нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа становила 0,882 тоді як фактична гетерозиготність склала 0,659. Ефективне число алелей становило 8,5 %. Коефіцієнт інбридингу відносно популяції у коропів української рамчастої породи становив 0,093.

За використання праймера (AGC)₆G молекулярна маса на електрофореграмах коливалася в значних межах 240 п.н. – 1000 п.н. у нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа. Частота алельних варіантів довжиною 450 п.н., 270 п.н., становила 20,8 %. Частота алельних варіантів довжиною 550 п.н. та 1000 п.н. становила 4 %. Очікувана гетерозиготність у нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа становила 0,846 тоді як фактична гетерозиготність склала 0,442. Ефективне число алелей становило 6,5 %. Коефіцієнт інбридингу відносно популяції у коропів української рамчастої породи становив 0,478.

У групі нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа за використання праймера (GAG)₆C сумарно виявлено 28 ампліконів розмір яких знаходився у межах 250–1500 п.н. Частота алельних варіантів довжиною 450 п.н., і 750 п.н. становила 14,2 %. Частота алельних варіантів довжиною 400 п.н., 1500 п.н., становила 11 %. Очікувана гетерозиготність у нивківського внутрішньопорідного типу рамчастого коропа становила 0,878 тоді як фактична гетерозиготність склала 0,858. Ефективне число алелей

становило 8,2 %. Коефіцієнт інбридингу відносно популяції у коропів української рамчастої породи становив 0,023.

Результати проведених досліджень з використанням методики на підставі поліморфізму ДНК-маркерів показали, що для індивідуального генотипування необхідно підбирати високоспецифічні маркери, поліморфізм за якими можна виявляти на рівні особин. Даний метод придатний для аналізу популяцій коропа і доцільний для порідного маркування на рівні міжпорідних груп коропа. На підставі результатів досліджень можна стверджувати, що даний метод аналізу часто повторюваних послідовностей ядерної ДНК цілком придатний для популяційного генотипування і аналізу філогенетичних відносин порід коропа. В цілому, результати аналізу з використанням ISSR-маркерів узгоджуються з даними проведеного дослідження із застосуванням генетико-біохімічних систем. Використання мікросателітної панелі ISSR-маркерів для генотипування коропів, а саме, виявлення міжпорідних відмінностей між лускатою та рамчастою породами надає додаткові можливості для проведення комплексної оцінки коропових риб, які вирощуються в рибницьких господарствах України.

При дослідженні українських популяцій білого та строкатого товстолобів було проаналізовано генотипи особин за використання п'яти праймерів (CTC)₆C, (GAG)₆C, (AGC)₆G, (ACC)₆G, (AGC)₆C [182, 212].

При аналізі популяційно-генетичної структури, за окремими локусами маркерів, окремих популяцій строкатого товстолоба виявлені достовірні відмінності за праймерами (CTC)₆C та (GAG)₆C.

У популяції строкатого товстолоба ДВСПП «Лиманське» за використання праймеру (CTC)₆C сумарно виявлено 18 ампліконів, розмір яких знаходився у межах 2500–750 пар нуклеотидів. Спектри нараховували від 2 до 5-ти ампліконів.

За локусом (CTC)₆C у популяції ДВСПП «Лиманське» виявлено вісім бендів. Кількість ампліконів довжиною 1000 п.н., 750 п.н. становила 16,8 %. Кількість ампліконів довжиною 2500 п.н., 1900 п.н., та 1500 п.н. становила 5,6 %. Кількість ампліконів довжиною 1600 п.н., та 900 п.н. становила 11 % (рис. 3.8).

У популяції строкатого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» за використання праймеру (CTC)₆C сумарно виявлено 26 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 1000–500 пар нунлеотидів. Спектри від 1 до 9-ти ампліконів.

За локусом (CTC)₆C у популяції виявлено шість бендів. Кількість ампліконів довжиною 1000 п.н., 700 п.н. становила 23 %.

Кількість ампліконів довжиною 800 п.н., та 750 п.н. становила 7,69 %. З різним відсотковим співвідношенням детектувались амплікони довжиною 850 п.н., та 500 п.н.

У популяції строкатого товстолоба «Донрибкомбінат» за використання праймеру (СТС)₆C сумарно виявлено 21 амплікон, розмір яких знаходився у межах 2000–900 пар нуклеотидів. За локусом (СТС)₆C у популяції виявлено п'ять бендів. Кількість ампліконів довжиною 1200 п.н., 1000 п.н. становила 14,3 %. Найбільша кількість ампліконів була довжиною 900 п.н. і становила 43 %

Також за даним локусом в трьох досліджуваних популяціях виявлена наявність одного спільного алельного варіанту – 1000 п.н. За локусом в популяції ДВСП «Лиманське» та ДП рибгосп «Галицький» у строкатого товстолоба виявлена наявність одного спільного алельного варіанту – 750 п.н. За локусом в популяції ДВСП «Лиманське» та «Донрибкомбінат» у строкатого товстолоба виявлена наявність одного спільного алельного варіанту – 1500 п.н. та 900 п.н.

За використання праймера (GAG)₆C при порівнянні двох господарств ДВСП «Лиманське» та ДП рибгосп «Галицький» нами виявлена специфіка генетичної структури отриманих ампліконів в залежності від географічного розташування господарств.

За локусом (AGC)₆G в трьох популяціях виявлено десять алелів. У популяції ДВСП «Лиманське» нами були виявлені алельні варіанти: 450 п.н., 500 п.н. зустрічалися з однаковим відсотковим співвідношенням 15,2 %, алельні варіанти 2000 п.н., 1500 п.н., 1200 п.н., 1000 п.н. – 3 %, решта алельних варіантів детектувались з різним відсотковим співвідношенням.

За локусом (AGC)₆G в популяції ДП «Галицький» виявлено десять алелів. Виявлені нами алельні варіанти: 2000 п.н., 1500 п.н., 1400 п.н., 1200 п.н. та 450 п.н., 250 п.н. кількість ампліконів становила 2,5 %. Найбільша кількість ампліконів була довжиною 750 п.н. і становила 25 %.

За локусом (AGC)₆G в популяції «Донрибкомбінат» виявлено одинадцять алелів. Найбільша кількість алелів – 2000 п.н., найменша – 300 п.н. Кількість ампліконів довжиною 800 п.н., 600 п.н. становила 16 %. Найбільша кількість ампліконів була довжиною 300 п.н. і становила 20 %.

У результаті досліджень двох популяцій ДВСП «Лиманське» та ДП рибгосп «Галицький» у білого товстолоба за ISSR праймерами виявлені відмінності в генетичній структурі спектрів алелів.

У популяції білого товстолоба ДВСРП «Лиманське» за використання праймеру (СТС)₆С сумарно виявлено 23 продукти ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 2000–750 нуклеотидів. Спектри нараховували від 2 до 6-ти ампліконів.

За праймером (СТС)₆С виявлено вісім ампліконів. Кількість ампліконів довжиною 1900 п.н., 900 п.н. становила 17,4 %. Кількість ампліконів довжиною 1800 п.н., 1600 п.н., та 1000 п.н. становила 8,7 %.

У популяції білого товстолоба ДВСРП «Лиманське» за використання праймеру (GAG)₆С сумарно виявлено 25 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 3500–1300 пар нуклеотидів. Спектри нараховували від 2 до 5-ти ампліконів. За праймером (GAG)₆С виявлено шість бендів. Кількість ампліконів довжиною 3500 п.н., 3000 п.н., 1800 п.н. становила 16 %. Кількість ампліконів довжиною 1500 п.н., 1400 п.н. становила 20 %.

У популяції білого товстолоба ДВСРП «Лиманське» за використання праймеру (AGC)₆С сумарно виявлено 22 продукти ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 2000–450 пар нуклеотидів. Спектри нараховували від 2 до 8-ми ампліконів. За праймером (AGC)₆С виявлено вісім бендів. Кількість ампліконів довжиною 1800 п.н., 500 п.н. становила 18 %. Кількість ампліконів довжиною 750 п.н., 450 п.н. становила 10 %. Кількість ампліконів довжиною 1700 п.н. становила 23 %.

У популяції білого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» за праймером (СТС)₆С сумарно виявлено 39 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 2500–750 нуклеотидів. Спектри включали від 1 до 9-ти бендів. Найбільша кількість ампліконів була довжиною 750 п.н і становила 23 %. За праймером (СТС)₆С в популяціях виявлено вісім алейних варіантів.

Слід зазначити, що за локусом (СТС)₆С в популяціях ДВСРП «Лиманське» та ДП «Галицький» виявлено однакову кількість алелів – вісім. З них спільними для обох популяцій були алікони дожиною 750 п.н; 1000 п.н; 1500 п.н; 1800 п.н; 2000 п.н. Слід, також, відмітити специфічне відсоткове співвідношення спектрів ампліконів у досліджених популяцій. Найбільша кількість (22 % і 23 % відповідно) коротких ампліконів дожиною 750 п.н виявлена в обох досліджених групах білого товстолобика.

Популяція білого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» за локусом (AGC)₆G, виявилась більш поліморфною в порівнянні з популяцією ДВСРП «Лиманське» про що свідчать виявлені десять алейних

варіантів за даним локусом, тоді як в популяції ДВСРП «Лиманське», всього лише – п'ять.

У популяції білого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» за локусом (AGC)₆G сумарно виявлено 39 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 3000–500 нуклеотидів. Спектри включали від 1 до 10-ти ампліконів. Аелельні варіанти 3000 п.н., 2000 п.н., 1000 п.н та 900 п.н. зустрічалися з однаковим відсотковим співвідношенням 5,12 %; 1300 п.н. та 550 п.н. – 12,8 %; 1500 п.н. та 1200 п.н. – 2,5 %. Варіанти ампліконів довжиною 500 п.н. та 750 п.н. становили найбільшу частку у дослідженій групі (23 %, 25,7 %).

У популяції білого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» за локусом (ACC)₆G сумарно виявлено 37 продуктів ампліфікації, розмір яких знаходився у межах 2000–450 нуклеотидів. Спектри включали від 1 до 5-ти ампліконів. Аелельні варіанти 2000 п.н., 1900 п.н., зустрічалися з однаковим відсотковим співвідношенням 2,7 %; 1500 п.н. та 1200 п.н. – 5,4 %; 1000 п.н. та 750 п.н. – 11 %. Варіанти ампліконів довжиною 650 п.н., 550 п.н., 500 п.н. та 450 п.н. становили найбільшу частку у дослідженій групі 13,5 %.

У популяції білого товстолоба ДВСРП «Лиманське» за локусом (AGC)₆G нами було виявлено п'ять аелелів, розмір яких знаходився у межах 1300–450 пар нуклеотидів. Аелельні варіанти 600 п.н., та 450 п.н. зустрічалися з однаковим відсотковим співвідношенням 14 %.

Слід зазначити, що за локусом (AGC)₆G в популяціях ДВСРП «Лиманське» та ДП «Галицький» за даним локусом виявлено один спільний аелельний варіант 750 п.н. з високою сумарною часткою (29 % і 25,7 % відповідно).

Ґрунтуючись на отриманих результатах аналізу розподілу аелелів за ISSR-маркерами, встановлені певні специфічні особливості популяцій білого товстолоба ДП рибгосп «Галицький» ДВСРП «Лиманське», та ВАТ «Донрибкомбінат».

Виходячи з отриманих результатів, обрані для вивчення поліморфізму ISSR локуси ДНК для різних популяцій білого товстолоба мають різний рівень поліморфізму, яке характеризується кількістю аелелів. Фактичні відмінності між популяціями товстолюбиків досліджених господарств відрізняються характерними особливостями даних популяцій, відтворених у рибоводних господарствах, а також можуть характеризувати напрямок селекційно-племінної роботи, яка ведеться в даних господарствах.

Таким чином, за використання молекулярно-генетичних маркерів, проведений ISSR-аналіз дозволив вивчити генетичну

мінливість товстолобиків на популяційному рівні. Молекулярний аналіз дозволив встановити генетичний поліморфізм. Крім специфічних маркерів в ISSR-спектрах були виявлені унікальні поліморфні ДНК-фрагменти, притаманні окремим популяціям на рівні виду.

Виявлені в ході даної роботи специфічні «популяційні» поліморфні ISSR-маркери дозволяють використовувати отримані дані в подальших дослідженнях з розробки генетичної паспортизації з використанням існуючих сучасних методик. В подальшому запропоновані генетичні паспорти дозволяють ідентифікувати приналежність риб не тільки до виду, але до конкретної популяції, що дасть можливість використовувати їх в якості основи для подальших всебічних досліджень для молекулярного маркування на популяційному рівні та для встановлення філогенетичних зв'язків, геномного профілю виду, породи, внутрішньопородної групи, а також моніторингу генетичної структури риб, а в цілому також, для різних видів сільськогосподарських тварин.

Метою вивчення популяційно-генетичних досліджень є структура та динаміка генофонду; процесів, які виникають у цих популяціях; генетичних наслідків різних типів схрещувань; впливу штучного добору на спадкові ознаки організму; значення чинників довкілля для розвитку ознак тощо.

Дослідження генетичної структури сприяють ефективному відбору плідників із метою подальшого їх використання при отриманні гібридного потомства від коропа та сазана. Гібридизацію широко застосовують у рибництві завдяки легкому схрещуванню риб у межах виду, використанню штучного осіменіння при заводському розведенні, а також значній плодючості риб, що дозволяє отримувати гібриди у масових кількостях із необхідними комбінаціями генів. У сучасних дослідженнях генетичної структури здебільшого використовують підходи ідентифікації поліморфізму на рівні ДНК [2; 10; 14]. Що обумовлено, насамперед, можливістю проведення адекватного оцінювання як міжпородної, так і внутрішньопородної мінливості досліджуваних особин. Саме застосування у дослідженнях значної кількості маркерів при жорсткому відборі особин із унікальним поєднанням ознак є основним шляхом для вивчення можливих взаємозв'язків між різними морфофізіологічними системами на рівні ДНК [24; 27].

Одним із методів, який дозволяє, до певної міри, провести аналіз генетичної структури, оцінку генетичної різноманітності популяцій

і ступеня інбредності, оцінку генетичних відстаней між лініями, породами і популяціями тварин, філогенетичних взаємовідносин, є метод за використання ISSR-PCR аналізу. Враховуючи, що ISSR-метод має високу відтворюваність і не потребує ін формації про нуклеотидні послідовності, його можна з успіхом застосовувати для виявлення внутрішньовидової генетичної мінливості та ідентифікації популяцій чи ліній [29; 30].

Очевидно також, що і розробка генетично обґрунтованих програм для збереження, поліпшення і раціонального використання генофондів риб неможлива без глибоких досліджень особливостей їхніх генетичних структур. Такі дослідження є також основою визначення ймовірності прояву того чи іншого стану ознаки у майбутніх нащадків. З метою вивчення внутрішньопопуляційної генетичної консолідації та пошуку генетичних відмінностей і з'ясування можливого впливу на її генетичну структуру умов розведення в роботі виконано порівняльний аналіз розподілу фрагментів ДНК у групи сазана амурського за використання ISSR-методу. У дослідженнях використовували особин амурського сазана зі стада, що утримується у рибецеху Конотоп ВАТ Сумирибгосп.

Специфіку генетичної структури у сазана Амурського досліджували за ISSR-PCR методикою виявлення поліморфізму фрагментів ДНК. Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували праймери з наступними послідовностями: (СТС)6С, (АГС)6С, (АГС)6G, (GAG)6С, (АСС)6G. Встановлення поліморфізму ДНК відібраних об'єктів досліджень проводили шляхом аналізу спектра отриманих ампліконів. Для одержання матричного спектра в ISSR-PCR методиці використано праймери, структура яких дозволяла оцінити гетерогенність представленої популяції (чотири складові праймери містили 1 якір і 3 тринуклеотиди). На одержаній електрофореграмі спостерігались спектри, що містили специфічні паттерни ампліконів, їх кількість коливалась в інтервалі від 3 до 10 дискретних смуг.

Така вузькодіапазонна варіабельність свідчить про те, що високий ступінь поліморфізму притаманний не всім локусам, які можна було дослідити з допомогою обраних нами праймерів. Одержані спектри оцінювали на гетерогенність зразків. Праймери (СТС)6С і (АСС)6G давали однаковий діапазон молекулярних мас ампліконів (1500–350). Деяко меншу межу розподілу демонстрували праймери (АГС)6С і (АГС)6G (1200–450 та 1100–300 нуклеотидів відповідно). Найменша межа розподілу спостерігалась при використанні праймеру (GAG)6С – 1100–600 нуклеотидів.

Одержані паттерни ампліконів представлені як мажорними (чіткі), так і мінорними (більш розмиті) смугами. За однакової кількості копій повторностей у геномі вираженість коротших фрагментів характеризується меншою інтенсивністю світіння. Ця особливість є причиною виникнення мінорної смуги. Таким чином, у аналізі спектрів враховували залежність інтенсивності світіння як від кількості копій, так і від розміру амплікона. Приміром, для праймера (СТС)6С відмічалось 4 мажорних та 5 мінорних ампліконів, для праймера (AGC)6С – 4 мажорні, для праймера (AGC)6G – 4 мажорні та 6 мінорних, для праймера (GAG)6С – 3 мажорні та 2 мінорні смуги, а для праймера (ACG)6G – 3 мажорних та 7 мінорних. Відомо, що представники корошових, зокрема лускатий короп, характеризуються відсутністю внутрішньопопуляційної варіабельності електрофоретичних спектрів ISSR-PCR ампліконів [29; 30]. Як бачимо, наші дослідження також не показали суттєвої мінливості таких спектрів при використанні даних праймерів у амурського сазана, а отже, доводять високий ступінь внутрішньопопуляційної консервативності.

Залежно від обраного праймеру, мікросателітні послідовності ядерної ДНК особин амурського сазана, використаного у наших дослідженнях, демонстрували дещо різний ступінь внутрішньопопуляційної ідентичності. За літературними даними для індивідуального маркування необхідно використовувати такі праймери, за якими поліморфізм можна встановити лише на рівні особини [30]. Очевидно, що такі праймери мають бути високо специфічними. Праймери, використані у нашій роботі, є цілком придатними для аналізу генетичної структури на рівні популяції або для маркування в межах вибірки.

Загалом наші дослідження та дані, отримані при застосуванні різних праймерів, свідчать про те, що в дослідженій групі сазана існують суттєві відмінності. Використані послідовності ядерної ДНК, що повторюються, можуть бути застосовані для внутрішньопопуляційного генотипування. Зважаючи на відносну простоту ISSR-PCR методу та незначні витрати для проведення досліджень із його використанням, такий аналіз є перспективним методом при дослідженні популяцій риб.

Висновки

При використанні 7-ми генетико – біохімічних систем виявлено породоспецифічні особливості будови генетичної структури лускатих і рамчастих коропів антонінсько – зозуленецького внутріш-

ньо порідного типу. За досліджуваними генетико-біохімічним системам вивлено поліморфізм за локусами TF, ALB, EST, а такі системи як CP, AM, PN, HB представлені мономорфними локусами. Підвищена аельна і генотипова одноманітність досліджених внутрішньопородних типів лускатого і рамчастих коропів, очевидно, могла бути зумовлена відносно високою інтенсивністю проведеної з ними селекційної роботи. Встановлені видові особливості генетичної структури популяцій товстолобиків. У групі строкатого товстолобика виявлена значна кількість досліджених генетико-біохімічних систем представлена надлишком гетерозиготних особин, порівняно із групою білого товстолобика. Виходячи із значень середньої гетерозиготності, досліджувані вибірки племінного ядра амурського сазана провідних племінних підприємств з розведення амурського сазана характеризуються високим розмахом генетичної мінливості і потребують в подальшому генетичної консолідації. Таким чином, обрані генетико-біохімічні системи, в поєднанні з фенотиповими ознаками дадуть змогу, в подальшому, оцінити рівень генетичної мінливості, генотиповий склад, ступінь внутрішньо – і міжпопуляційної диференціації, які є обов'язковими при проведенні селекційно-племінної роботи в риборицтві.

Результати проведених досліджень з використанням методики на підставі поліморфізму ДНК-маркерів показали, що для індивідуального генотипування необхідно підбирати високо-специфічні маркери, поліморфізм за якими можна виявляти на рівні особин. Даний метод придатний для аналізу популяцій коропових і доцільний для порідного маркування на рівні міжпорідних груп коропових. На підставі результатів досліджень можна стверджувати, що даний метод аналізу часто повторюваних послідовностей ядерної ДНК цілком придатний для популяційного генотипування і аналізу філогенетичних відносин порід коропових. Ґрунтуючись на вищевикладеному матеріалі, вважаємо, що отримані дані щодо поліморфізму ядерної ДНК основних об'єктів риборицтва повинні бути покладені в основу ведення раціональної селекційної роботи в племінних рибоводних господарствах України. Вони також дають можливість вивчення популяційних і філогенетичних процесів в даних популяціях.

Список використаних джерел:

1. Avise J. Molecular markers, natural history and evolution. USA : Champan & Hall. ITP International Thomson Pub. Comp., 2003. 511 p.

2. O'Reilly P., Wright J. M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture : *Journal of Fish Biology*. 1995. Vol. 47. P. 29–55.
3. Алтухов Ю. П., Рычков Ю. Г. Популяционные системы и их структурные компоненты. *Генетическая стабильность и изменчивость : Общая биология*. 1970. Т. 31. С. 507–526.
4. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб. Ленинград : Наука, 1987. 520 с.
5. Аллендорф Ф. У., Риман Н., Аттер Ф. М. Генетика и управление рыбным хозяйством. *Популяционная генетика и управление рыбным хозяйством* / под ред. Риман Н., Аттер Ф. Москва : Агропромиздат, 1991. С. 15–36.
6. Демкина Н. В., Шарт Л. А., Баранова Н. А. Использование биохимических маркеров для оценки генетического разнообразия стад карпа. *Сборник научно-технологической и методической документации по аквакультуре*. Москва : ВНИРО, 2001. С. 117–131.
7. Демкина Н. В. Биохимические маркеры в селекции и разведении карповых рыб : дис. ... докт. биол. наук : 03.00.10. Москва, 2005. 256 с.
8. Паавер Т. Биохимическая генетика карпа (*Cyprinus carpio* L.). Таллинн : Валгус, 1983. 122 с.
9. Генетика изоферментов / Корочкин Л. И. и др. Москва : Наука, 1997. 275 с.
10. Wallace R. B. DNA recombinant technology. Boca Raton (Fla.) : CRC Press, 1983. 212 p.
11. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 2000. Vol. 109. P. 365–371.
12. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих / Глазко В. И. и др. *Сельскохозяйственная биология*. 2013. № 2. С. 71–76.
13. Phy-logeny of bovine species based on AFLP fingerprinting / Buntjer J.B., et al. *Heredity*. 2002. V. 88, № 1, P. 46.
14. Сулимова Г. И. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Генетика*. 1995. Т. 31, № 9. С. 1294–1299.
15. Comparative Analysis of Using Isozyme and ISSR-PCR Markers for Population Differentiation of Cyprinid Fish / Zhigileva O. N. et al. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2013. Vol. 13. P. 159–168.
16. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism in the Genus *Oryza* / Joshi S. P. et al. *Theor. Appl. Genet*. 2000. Vol. 100. P. 1311–1132.

17. Тарасюк С. І., Грициняк І. І. Молекулярно-генетичні дослідження в риборицтві : монографія. Київ : Аграрна наука, 2013. 312 с.

18. Грициняк І. І., Тарасюк С. І. Актуальні завдання генетичних досліджень у рибному господарстві. *Оптимальне використання, збереження і відтворення водних живих ресурсів – нагальні завдання товаровиробників рибопродукції та наукових установ рибної галузі* : матеріали наук.-практ. семінару, проведений 12 черв. 2009 р. під час виставки «FishExpo – 2009» : Київ : КПІ, 2010. С. 96–108.

19. Нагорнюк Т. А., Особа І. А., Тарасюк С. І. Аналіз генетичної структури короново-сазанових гібридів за використання окремих генетико-біохімічних систем. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2008. Вип. 4 (47). С. 180–186.

20. Грициняк І. І., Нагорнюк Т. А., Тарасюк С. І. Генетична структура порід і породних груп коропів за окремими генетико-біохімічними системами *Рибогосподарська наука України*. 2008. № 1. С. 29–33.

21. Борисенко Н. О., Тарасюк С. І. Використання генетико-біохімічних систем для диференціації білого та строкатого товстолобиків. *Рибне господарство*. 2009. Вип. 67. С. 25–29.

22. Олексієнко О. О., Томіленко В. Г., Кучеренко А. П. Інструкція з організації та ведення промислової гібридизації в коропівництві. *Інтенсивне риборицтво*. Київ : Аграрна наука, 1995. С. 74–83.

23. Глазко В. И., Глазко Г. В. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, геновая терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика : учеб. пос. Киев : КВИЦ, 2003. 640 с.

24. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.

25. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review / You-Chun L. et al. *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11. P. 2453–2465.

26. Manninen O., Kalendar R., Schulman A. H. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics*. 2000. Vol. 264, № 3. P. 325–334.

27. Baldi P., Basnee P. F. Sequence analysis by additive scale: DNA structure for sequences and repeats of all lengths. *Bioinformatics*. 2000. Vol. 16. P. 865–889.

28. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978. Vol. 89. P. 583–590.

29. Городная А. В., Мариуца А. Э., Тарасюк С. И. Исследование информативности ДНК маркеров при изучении специфики генети-

ческой структуры сазана амурского. *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. 2011. № 3. С. 46–51.

30. Городна О. В., Грициняк І. І., Тарасюк С. І. Особливості виявлення поліморфізму у коропових за використання ДНК маркерів. *Рибне господарство*. 2009. Вип. 66. С. 55–59.