



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 575.22;
639.3.03:639.371.5
© 2018

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА САЗАНА АМУРСЬКОГО ТзОВ «КАРПАТСЬКИЙ ВОДОГРАЙ»

*І.І. Грициняк¹, С.І. Тарасюк², О.В. Залоїло³,
А.Е. Маріуца⁴, Ю.М. Глушко⁵, О.А. Габуда⁶*

¹доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН

²доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН

³кандидат біологічних наук, ^{4, 5}кандидати сільськогосподарських наук

¹⁻⁵ Інститут рибного господарства НААН
вул. Обухівська, 135, м. Київ, 03164, Україна

⁶ ТзОВ «Карпатський водограй»

вул. Ставкова, 60, м. Пустомити Львівської обл., 81100, Україна

e-mail: ¹hrytsyniak@if.org.ua, ²tarasjuk@ukr.net, ³zaloilo@if.org.ua,

⁴mariusa16@ukr.net, ⁵niko-yulia@ukr.net, ⁶oleh.habuda@gmail.com

Надійшла 24.04.2018

Мета. Дослідити генетичну структуру племінного стада амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй» (Львівська обл.) з використанням різних типів маркерів і визначити рівень соматичного мутагенезу за мікроядерним тестом. **Методи.** Лабораторні дослідження, комп'ютерний статистичний аналіз. **Результати.** Досліджено генетичну структуру сазана амурського за окремими типами молекулярно-генетичних маркерів (ДНК-маркери, генетико-біохімічні системи). Виявлено видоспецифічні особливості генетичної структури за досліджуваними локусами. Розраховано рівень наявної та очікуваної гетерозиготності. Підвищена алельна і генотипова різноманітність генетичної структури може бути зумовлена дещо підвищеною інтенсивністю проведеної селекційної роботи. Виявлений надлишок гетерозигот за окремими локусами свідчить про наявність стабілізаційних процесів генетичної структури. Проведено дослідження рівня соматичного мутагенезу за використання мікроядерного тесту. **Висновки.** За використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів отримано інформацію про генетичну структуру сазана і її різноманіття на геномному рівні. Ці результати свідчать про те, що в її геномі збереглися стійкі генні комплекси, незважаючи на значний селекційний тиск. Застосовані генетично-статистичні підходи можна використати для моніторингу генетичної структури груп сазана України, встановлення рівня консолідації та філогенетичних зв'язків між ними з подальшою їх генетичною паспортизацією. Результати дослідження рівня соматичного мутагенезу за використання мікроядерного тесту показали, що досліджувана група риб характеризувалася середніми значеннями

еритроцитів з мікроядрами ЕМЯ ($4,7 \pm 0,3\%$), невисоким рівнем лімфоцитів з мікроядрами та двоядерних лімфоцитів, загальна кількість яких становила $3,5 \pm 0,3\%$. Ці показники свідчать про задовільні умови розведення.

Ключові слова: сазан амурський, генетична структура, ДНК-маркери, генетико-біохімічні маркери, поліморфізм, мікроядерний тест.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-06>

Історія інтродукції амурського сазана на території України починається з 1954 р. Зацікавленість амурським сазаном пов'язана з його вищою зимостійкістю, резистентністю до хвороб, швидкими темпами росту та кращою загальною виживаністю порівняно з коропом, що зумовлює загальне зростання рибопродуктивності ставів на 18–20% при вирощуванні коропо-сазанових гібридів, яким притаманний значний ефект гетерозису.

Ефективне ведення ставового рибництва на території України передбачає використання низки селекційно-плеєнних методів з підвищення продуктивності вирощуваної риби. Важливим складником процесу селекції та забезпечення рибництва чистопородним високопродуктивним плеєнним матеріалом сазана є постійний генетичний моніторинг репродуктивного потенціалу популяції, який дає змогу контролювати її стан і вносити корективи. Ідентифікація генотипів за окремими генами дає можливість вивчати динамічні зміни частот алелів у процесі селекції, що дає змогу контролювати плеєнну роботу [1].

Незважаючи на велику кількість методів маркування мінливості генетичного матеріалу, для вирішення селекційно-генетичних завдань у рибництві найширше використовують поліморфізм за локусами генетико-біохімічних систем та аналіз поліморфізму різних ділянок ДНК і нуклеотидних

послідовностей ДНК (ДНК-маркери) [2].

Дослідження генетичної структури популяції амурського сазана на території України є також важливим з погляду популяційної генетики, оскільки вони дають можливість дослідити механізми та рівень змін на генетичному рівні амурського сазана в процесі акліматизації.

Мета досліджень — метою нашої роботи було дослідження генетичної структури плеєнного стада амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй» (Львівська обл.) з використанням різних типів маркерів і визначення рівня соматичного мутагенезу за використання мікроядерного тесту.

Матеріали та методи досліджень. Як матеріал для досліджень використовували зразки крові, відібрані з хвостової вени особин амурського сазана (*Cyprinus carpio haematopterus*) ТзОВ «Карпатський водограй» (n=31 особина).

Загальну ДНК виділено за стандартною методикою, за використання набору Gene JET Whole Blood Genomik DNA Purification Mini Kit (США). Концентрацію ДНК визначено на біофотометрі Eppendorf Bio Photometr.

Для дослідження генетичної структури амурського сазана використовували 3 мікросателітні маркери: MFW 06, MFW 15, MFW 23 [3] (табл. 1).

ПЛР проводили на ампліфікаторі «Termo scientific» (Arktik Termal Cycler, США) у такому

1. Нуклеотидні послідовності праймерів

Локус	Послідовність праймерів 5'–3'	Температура відпалу праймерів, °С
MFW 15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R: GTTCACAAGGTCATTTCCAGC	54
MFW 23	F:GTATAATTGGGAGTTTTAGGG R:CAGGTTTATCTCCCTTCTAG	55
MFW 06	F: ACCTGATCAATCCCTGGCTC R:TTGGGACTTTTAAATCACGTTG	55

температурному режимі: 5 хв за 94°C; 33 цикли: 1 хв за 94°C, 30 с за 53–55°C (залежно від локусу), 30 с за 72°C; 5 хв за 72°C. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 0,2 ммоль dNTP, 1 од. Тагполімерази, 50 нг ДНК, 1,7 ммоль MgCl₂ і по 0,2 мкм праймерів. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації здійснювали у 4%-му агарозному гелі з використанням 1-TAE-буфера. Обробку і аналіз гелів проводили за допомогою програми Totallab v2.01. Статистичну обробку отриманих результатів виконували в програмі GelStat.

Для аналізу досліджуваних популяцій за генетико-біохімічними маркерами використовували розподіл алельних і генотипних частот за локусами трансферину (Tf), естерази (Est) та альбуміну (Alb), малатдегідрогенази (MDH), малік-ензиму (ME), карбоангідрази (KA). Електрофоретичний розподіл білків здійснювали в поліакриламідному 9%-му гелі з подальшим гістохімічним фарбуванням [4]. Математичну обробку даних виконували за допомогою комп'ютерної програми «BIOSYS» [5]. Відхилення фактичних частот від теоретично очікуваних зі співвідношення Харді-Вайнберга вираховували за використання критерію Пірсона [6]. Критичне значення χ^2 брали для 5%-го рівня значущості.

У роботі проведено дослідження рівня цитогенетичних порушень за використання мікроядерного тесту в клітинах периферійної крові. У мазках крові підраховували частоту еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ), двоядерних лейкоцитів (ДЛ), одноядерних лейкоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), апоптозних клітин (А) та «амітозних» еритроцитів, тобто еритроцитів у стані ділення (ДЕ). Одержані дані розраховували в промілях (%). Фарбовані цитогенетичні препарати аналізували за допомогою бінокулярного мікроскопа Carl Zeiss при збільшенні в 1000 разів. Клітини фотографували за допомогою фотоапарата Canon (PowerShot G6). Статистичну достовірність розбіжностей частот цитогенетичних аномалій між групами тварин оцінювали за критерієм Ст'юдента (t_s) [7].

Результати досліджень. ДНК-маркери. Проаналізовано генотипи особин

амурського сазана з використанням трьох мікросателітних локусів ДНК: MFW 06, MFW 15, MFW 23. У ході роботи підбрано оптимальні умови для проведення SSR-PCR аналізу. Дослідження дали змогу визначити чинники, які мають найбільший вплив на ефективність ампліфікації SSR-алелей амурського сазана, а саме: концентрацію препарату ДНК, концентрацію праймера у реакційній суміші та кількість циклів ампліфікації. Для отримання чітких і відтворюваних алелей за кожним локусом індивідуально підбрано оптимальні умови проведення ПЛР. Приклади отриманих SSR-спектрів наведено нижче (рис. 1, а, б)

У дослідженій групі генотипів за 3-ма мікросателітними локусами було виявлено всього 16 алелей з молекулярною масою 90 — 280 пар нуклеотидів (п.н.). Кількість алелей на локус варіювало від 5 до 6. Найбільш поліморфним був маркер MFW 15 (виявлено 6 алельних варіантів), а за використання маркерів MFW 23 та MFW 06 виявлено по 5 алелей (табл. 2).

За локусом MFW 15 з найбільшою частотою траплялися алельні варіанти довжиною 260 п.н. — 31,25% (виявлено у 83% особин), а з найменшою частотою — 6,27%, алельні варіанти 255 п.н., що було виявлено у 17% досліджених особин. За використання маркера MFW 23 алель довжиною 145 п.н. виявляли з найвищою частотою — 34,48% (у 83% особин), 110 п.н. — з частотою 24,14%, 90 п.н. — 17,24%, 140 п.н. — 13,79% та алельний варіант довжиною 122 п.н. виявлено з найнижчою

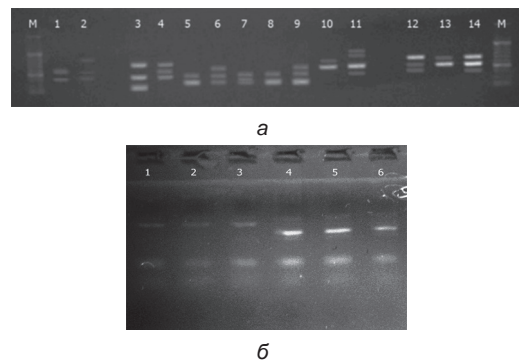


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації SSR-PCR за локусами: а — MFW 15 (10–14), MFW 06 (1–9); б — MFW 23 (1–6); М — маркер молекулярної маси

2. Частота ідентифікованих алельних варіантів у особин амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй»

Локус	Частота алелей, %	
MFW 15	230	21,87
	245	12,49
	255	6,265
	260	31,25
	272	15,63
MFW 23	280	12,49
	90	17,24
	110	24,14
	122	10,35
MFW 06	140	13,79
	145	34,48
	120	20,00
	140	20,00
	150	33,33
	165	10,00
	180	16,66

частотою — 10,35% (у 25% особин). У результаті досліджень за використання мікросателітного локусу MFW 6 було виявлено 5 алельних варіантів молекулярною масою 120–180 п.н. З найвищою частотою (33,3%) траплявся алель довжиною 150 п.н. (виявлений у 80% особин), а з найнижчою (10%) — алельний варіант 165 п.н. (у 25% досліджуваних особин).

За розрахунками алельних частот було визначено основні показники генетичної мінливості (табл. 3).

Показники очікуваної гетерозиготності використовували для обчислення коефіцієнта інбридингу, який виражає ступінь інбридингу в популяції. Найвищий рівень наявної гетерозиготності виявлено для локусу

MFW 23 (77,3%), найнижчий — для локусу MFW 06 (70,4%). Розрахункові значення очікуваної (H_e) гетерозиготності загалом були вищі за значення фактичної (H_o). Найбільша невідповідність між очікуваною гетерозиготністю (H_e) та фактичною (H_o) свідчить про її дефіцит, характерний для дослідженої популяції сазана амурського за використання мікросателітного локусу MFW 06. Фактичне збільшення рівня гомозиготності за цим локусом може бути пов'язане з багатьма чинниками, зокрема відбором особин за конкретними продуктивними якостями, а також можливістю появи нульових алелей, але це припущення потребує проведення низки ширших досліджень.

Ефективна кількість алелей (показник, який характеризує локуси за частотою виявлення алелей) у досліджуваній вибірці генотипів варіювало від 4,23 (MFW 23) до 4,57 (MFW 15). Середня ефективна кількість алелей на локус — 4,45. Розрахунок індексу інбридингу F особин відносно популяції вказує на наявність незначного надлишку гетерозигот за локусом MFW 23 ($F = -0,011$). Середнє значення коефіцієнта інбридингу (F) становило 0,061, що свідчить про відсутність інбридингу у дослідженій популяції (див. табл. 3).

Генетико-біохімічні системи. У результаті проведених досліджень генетичної структури амурського сазана за генетико-біохімічними системами виявлено 5 алельних форм за локусом трансферину: Tf A, Tf B, Tf C1, Tf C2, Tf D (табл. 4). Найпоширеніші генотипи є ті, які включають алелі Tf C1, Tf C2. За порівняння фактичних і теоретичних частот генотипів виявлено невеликий надлишок гетерозигот. У плідників плем'ядра частота алеля Tf A була найвищою і становила 0,417, найменша частота у алеля

3. Характеристики мікросателітних локусів ДНК

Локус	Розмір, п.н.	n_a	n_e	H_o	H_e	F
MFW 15	230–280	6	4,566	0,706	0,781	0,096
MFW 23	90–145	5	4,237	0,773	0,764	-0,011
MFW 06	120–180	5	4,545	0,704	0,780	0,097
Середнє	—	5,33	4,45	0,728	0,775	0,061

Примітка. n_a — кількість алелей; n_e — ефективна кількість алелей; H_o — фактична гетерозиготність; H_e — очікувана гетерозиготність.

Tf B — 0,050. Аналіз відповідності фактичного розподілу щодо закону Харді-Вайнберга за локусом трансферину виявив те, що фактична гетерозиготність у популяції ($H_o=0,900$) є вищою за очікувану ($H_e=0,733$).

Дехто з дослідників зазначає, що наявність у далекосхідного сазана підвищеної концентрації алеля Tf D ($q=0,64$), тоді як у європейських популяціях сазана і коропа цей алель трапляється з низькою частотою [8–10]. У групи сазана господарства ТзОВ «Карпатський водограй» нами також виявлено цей алель трансферину, що траплявся з частотою 0,150 і за цим показником є характерним для європейських популяцій амурського сазана, тоді як для далекосхідних популяцій є притаманним переважання саме алеля D. Виявлені алельні варіанти створили 13 комбінацій генотипів із 15-ти можливих. Генотипів C_2C_2 , C_2D не виявлено зовсім, переважно трапляються генотипи AC_1C_2 та AD. Наявна гомозиготність за локусом трансферину — 25%, а гетерозиготність, відповідно — 75%.

Європейські популяції амурського сазана характеризуються високою (64%) частотою алеля A [10]. Частота повільного алеля D коливалася залежно від досліджуваної популяції в межах 10–15,5%, частка алеля B у досліджених нами популяціях була у межах 10–20,7%, що є характерним для європейських популяцій сазанів [11].

У проведених популяційно-генетичних дослідженнях локус Est-1 — поліморфний і має 3 генотипи — FF, FS і SS. Виявлено 2 зони естерази: F — швидка і S — повільна форми. Частота зустрічальності алельного варіанта F — 0,450, S — 0,550. Спостерігається виражений статистично достовірний надлишок гетерозигот (17; 15) за локусом Est ($\chi^2=0,491$, $P=0,484$). За локусом Est у популяції переважала частота Est S. У популяції спостерігався неврівноважений стан за локусом естерази, оскільки наявний статистично достовірний надлишок гетерозигот згідно із законом Харді-Вайнберга.

За локусом альбуміну в сазана, як і в більшості риб інших видів [8,10,11], виявлено 2 алелі A і B. Переважала частота зустрічальності алельного варіанта A — 0,550. У найбільш урівноваженому стані

перебувають алельні частоти за локусом альбуміну. За цим локусом виявлено надлишок гетерозигот AB (21;15).

Результати досліджень за локусом MDH виявили 2 електрофоретичні варіанти цього ферменту: форми F і S. У досліджуваному стаді переважала частота MDH F (див. табл. 4) і спостерігався врівноважений стан за цим локусом, оскільки немає статистично достовірних відмінностей фактичного розподілу генотипів від очікуваного за розподілом закону Харді-Вайнберга. Хоча за цим локусом у амурського сазана є тенденція до надлишку фактичних гетерозиготних генотипів над теоретично очікуваними.

Нами виявлено 2 алельні форми малік-ензиму: ME S і ME F. За розподілом алельних частот (див. табл. 4) у досліджуваній популяції переважала швидка форма (0,533). Розподіл генотипів за локусом ME виявив незначну тенденцію до надлишку гетерозигот, значення фактичної гетерозиготності становило 0,862.

Локус карбоангідази у досліджуваній групі амурського сазана виявився поліморфним і містив ген «швидкого» (S) і «повільного» (F) алельних варіантів ферменту (див. табл. 4). Оскільки розподіл фактичних генотипів статистично не відрізнявся від теоретичного, можна стверджувати, що популяція сазана за цим локусом є врівноваженою.

Під час оцінки динаміки генетичного стану популяції важливим параметром є гетерозиготність (H). Мутаційний процес, різні типи відбору, дрейф генів та інші чинники популяційної динаміки часто впливають на гетерозиготність популяції, особливо за обмеженого потоку генів, тому її оцінка в популяційних дослідженнях є обов'язковою. За величиною зростання гетерозиготності за високополіморфними локусами можна оцінювати ефективну величину популяції батьків або оптимальне кількісне співвідношення самок і самців у популяції та її величину [9,12]. З-поміж 6-ти досліджених локусів найбільшу різницю між фактичною гетерозиготністю й очікуваною виявлено у локусах Alb, ME, Tf (табл. 5).

Відмінності між наявною та очікуваною гетерозиготністю свідчать про випадковість у зростанні частот окремих алелей

4. Частоти алелей поліморфних локусів та їх генотипи в популяції амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй»

Локус	Алеель	Частота	Генотип	Кількість генотипів		χ^2	P
				наявна	очікувана		
Tf	A	0,417	AA	3	5,085	7	74,9
			AB	2	1,271		
			AC ₁	8	6,356		
			AC ₂	4	3,390		
			AD	5	3,814		
	B	0,050	BB	0	0,051		
			BC ₁	1	0,763		
			BC ₂	0	0,407		
			BD	0	0,458		
	C ₁	0,250	C ₁ C ₁	3	2,034		
			C ₁ C ₂	3	2,288		
			C ₁ D	0	0,475		
	C ₂	0,133	C ₂ C ₂	0	0,470		
			C ₂ D	0	0,385		
			DD	1	1,220		
					H _o =0,733		
Est	F	0,450	FF	5	5,949	49	48,4
			FS	17	15,102		
			SS	8	8,949		
				H _o =0,503	H _e =0,567		
Alb	A	0,550	AA	6	8,949	5	3,0
			AB	21	15,102		
	B	0,450	BB	3	5,949		
				H _o =0,503	H _e =0,700		
MDH	F	0,683	FF	12	14	6	12,8
			FS	17	13		
			SS	1	3		
				H _o =0,690	H _e =0,495		
ME	F	0,533	FF	6	8,5	6	21,3
			FS	20	15		
	S	0,467	SS	4	6,5		
				H _o =0,862	H _e =0,500		
KA	F	0,666	FF	11	13,3	6	8,14
			FS	18	13,3		
			SS	1	3,3		
	S	0,334		H _o =0,552	H _e =0,437		

Примітка. H_o— фактична гетерозиготність; H_e— очікувана гетерозиготність (для табл. 4, 5).

у предків, що пов'язано з недостатнім рівнем обміну генів між субпопуляціями амурського сазана через вплив на них ізоляції. Аналіз відповідності фактичного

5. Рівень середньої гетерозиготності за дослідженими генетико-біохімічними системами

Локус /H	Tf	Est	MDH	ME	Alb	CA	За всіма локусами
H _e	0,900	0,567	0,495	0,500	0,700	0,437	0,599±0,033
H _o	0,733	0,503	0,690	0,862	0,503	0,552	0,640±0,016

розподілу щодо розподілу Харді-Вайнберга за локусом альбуміну виявив те, що фактична гетерозиготність у популяції (H_e=0,700) є вищою за очікувану (H_e=0,503).

Зростання частоти зустрічальності одних алелей і зниження частоти інших, на думку деяких авторів, можливе під час проведення штучного добору за будь-якими рибогосподарськими ознаками і залежить від умов утримання риб [12, 13].

Цитогенетичний аналіз. Численні дослідження свідчать, що кровотворна система риб є дуже чутливою до змін стану водного середовища, тому реєстрація морфологічно змінених клітин крові дає змогу швидко визначити чутливість вирощуваних риб до дії генотоксинів. Рівень хромосомних аберацій та геномних мутацій у клітинах периферійної крові риб безпосередньо залежить не лише від екологічного стану водойми, а й від виду досліджуваних представників аквакультури [14–16]. У своїх дослідженнях Ферга та Ель-Шехаві за використання мікроядерного тесту на 4-х видах риб виявили різні значення порушень хромосомного матеріалу [17].

У мазках крові ядерні еритроцити мали щільні компактні ядра овальної форми з яскраво вираженою цитоплазмою і характеризувалися поздовжнім діаметром від 12,4 до 17,8 мкм, поперечним — від 7,1 до 10,2 мкм. Ця особливість давала змогу легко їх відрізнити і проводити підрахунок мікроядер окремо для кожної групи клітин. Також досить легко типувалися і двоядерні лейкоцити, дещо підвищена частота яких у клітинах периферійної крові відображає

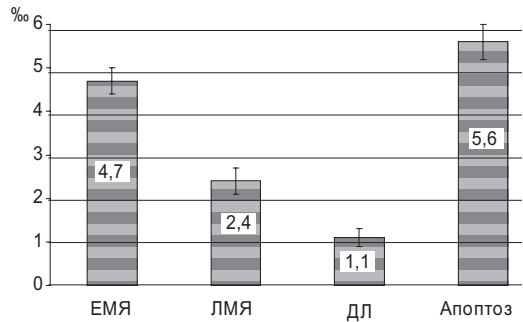


Рис 2. Рівень цитогенетичних показників у клітинах периферійної крові амурського сазана ТзОВ «Карпатський водограй»

порушення у кінцевій стадії мітотичного поділу — цитокінезу, апоптозні клітини і «амітозні» еритроцити, тобто еритроцити у стані ділення.

Було проведено моніторингові дослідження рівня соматичного мутагенезу у представників сазана амурського за використання мікроядерного тесту. За результатами цитогенетичного аналізу, досліджувана група характеризувалася середнім рівнем еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ) (4,7±0,3%). Крім того, виявлено, що для цих риб характерний порівняно невисокий рівень лімфоцитів з мікроядрами та двоядерних лімфоцитів, загальна кількість яких становила 3,5±0,3%, що свідчить про задовільні умови розведення (рис. 2).

Підвищений рівень апоптозу (5,6±0,4%) під час дослідження сазана у весняний період може бути результатом елімінації мутантних лімфоцитів та еритроцитів.

Висновки

З використанням різних типів молекулярно-генетичних маркерів (ДНК-маркери, генетико-біохімічні системи) отримано інформацію про генетичну структуру сазана і її різноманіття на геномному рівні. Ці

результати свідчать, що в її геномі збереглися стійкі генні комплекси, незважаючи на внутрішньовидову гібридизацію. Застосовані генетично-статистичні підходи можна використати для моніторингу

генетичної структури груп сазана України, установлення рівня консолідації та філогенетичних зв'язків між ними з подальшою їх генетичною паспортизацією. Проведено дослідження рівня соматичного мутагенезу за використання мікроядерного тесту.

Досліджувана група характеризувалася середнім рівнем еритроцитів з мікроядрами $4,7 \pm 0,3\%$, невисоким рівнем лімфоцитів з мікроядрами та двоядерних лімфоцитів, загальна кількість яких становила $3,5 \pm 0,3\%$, що свідчить про задовільні умови розведення.

Грициняк І.І.¹, Тарасюк С.І.², Залоїло О.В.³, Мариуца А.Є.⁴, Глушко Ю.Н.⁵, Габуда О.А.⁶

¹⁻⁵Інститут рибного господарства НААН, ул. Обуховська, 135, г. Київ, 03164, Україна, ⁶ООО «Карпатський водограй», ул. Ставковая, 60, г. Пустомыты Львовської обл., 81100, Україна; e-mail: ¹hrytsyniak@if.org.ua, ²tarasjuk@ukr.net, ³zaloilo@if.org.ua, ⁴mariutsa@ukr.net, ⁵niko-yulia@ukr.net, ⁶oleg.habuda@gmail.com

Генетическая структура сазана амурского ООО «Карпатский водограй»

Цель. Исследовать генетическую структуру племенного стада амурского сазана ООО «Карпатский водограй» (Львовская обл.) с использованием различных типов маркеров и определить уровень соматического мутагенеза микроядерным тестом. **Методы.** Лабораторные исследования, компьютерный статистический анализ. **Результаты.** Исследована генетическая структура сазана амурского по отдельным типам молекулярно-генетических маркеров (ДНК-маркеры, генетико-биохимические системы). Выявлены видоспецифические особенности генетической структуры по исследуемым локусам. Рассчитан уровень фактической и ожидаемой гетерозиготности. Повышенное аллельное и генотипическое разнообразие генетической структуры может быть обусловлено несколько повышенной интенсивностью проведенной селекционной работы. Обнаруженный избыток гетерозигот по отдельным локусам свидетельствует о наличии стабилизационных процессов генетической структуры. Проведено исследование уровня соматического мутагенеза при использовании микроядерного теста. **Выводы.** При использовании различных типов молекулярно-генетических маркеров получена информация о генетической структуре сазана и ее разнообразии на геномном уровне. Эти результаты свидетельствуют, что в геноме сохранились устойчивые генные комплексы, несмотря на значительное селекционное напряжение. Примененные генетически-статистические подходы могут быть использованы для мониторинга генетической структуры групп сазана Украины, установления уровня консолидации и филогенетических связей между ними, с последующей их генетической паспортизацией. Результаты исследований уровня соматического мутагенеза при использовании микроядерного теста показали,

что исследуемая группа рыб характеризовалась средним уровнем эритроцитов с микроядрами ЕМЯ ($4,7 \pm 0,3\%$), невысоким уровнем лимфоцитов с микроядрами и двухъядерных лимфоцитов, общее количество которых составило $3,5 \pm 0,3\%$, что свидетельствует об удовлетворительных условиях разведения.

Ключевые слова: сазан амурский, генетическая структура, ДНК-маркеры, генетико-биохимические маркеры, полиморфизм, микроядерный тест.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-06>

Grіtsyniak I.¹, Tarasiuk S.², Zaloilo O.³, Mariutsa A.⁴, Glushko Yu.⁵, Gabuda O.⁶

¹⁻⁵Institute of fishery of NAAS, Obukhivska Str., 135, Kyiv, 03164, Ukraine, ⁶«Karpatskyi vodohrai» Ltd., Stavkova Str., 60, Pustomyty, Lviv oblast, 81100, Ukraine; e-mail: ¹hrytsyniak@if.org.ua, ²tarasjuk@ukr.net, ³zaloilo@if.org.ua, ⁴mariutsa@ukr.net, ⁵niko-yulia@ukr.net, ⁶oleg.habuda@gmail.com

Genetic structure of Amur carp selected in «Karpatskyi vodohrai» Ltd.

The purpose. To study genetic structure of breed herd of Amur carp selected in «Karpatskyi vodohrai» Ltd. (Lviv oblast) with the use of different types of markers and to determine the level of somatic mutagenesis by the microkernel test.

Methods. Laboratory researches, computer statistical analysis. **Results.** Genetic structure of Amur carp on separate types of molecular-genetic markers (DNA-markers, genetic-biochemical systems) is studied. Species-specific features of genetic structure on probed loci are determined. The level of actual and expected heterozygosity is calculated. Increased allele and genotypic variety of genetic structure can be caused by a little heightened intensity of the carried out selection work. The detected excess of heterozygotes on separate loci testifies to presence of stabilization processes of genetic structure. Research of the level of somatic mutagenesis is also carried out at use of micronucleus test. **Conclusions.** At use of different types of molecular-genetic markers the information on genetic structure of a carp and its variety on genome level is gained. These results testify to the following: genome preserved resistant gene complexes, despite of significant selection effort. The applied genetical-statistical approaches can be used for monitoring genetic structure of groups of a carp of Ukraine,

determination of the level of consolidation and phylogenetic links between them with their subsequent genetic certification. Results of researches of the level of somatic mutagenesis at use of micronucleus test shown that the probed group of fishes was characterized by average level of erythrocytes with micronucleus MNE ($4,7 \pm 0,3\%$), low level of

lymphocytes with micronucleus and binucleate lymphocytes which total has made $3,5 \pm 0,3\%$ that in its turn testifies to satisfactory conditions of selection.

Key words: *Amur carp, genetic structure, DNA-marker, genetic-biochemical marker, polymorphy, micronucleus test.*

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201807-06>

Бібліографія

1. Грициняк І.І. Наукове забезпечення розвитку аквакультури та підвищення ефективності використання водних біоресурсів внутрішніх водойм України. *Рибогосподарська наука України*. 2010. № 1. С. 4–13.
2. Тарасюк С.І., Грициняк І.І. Молекулярно-генетичні методи в рибицтві: монографія. Київ: Аграрна наука, 2013. 312 с.
3. Crooijmans R., Bierbooms V., Komen J. et al. Mikrosatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*. 1997. V. 28. P. 129–134.
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. Москва: Мир, 2002. 589 с.
5. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematic. *J. Heredity*. 1981. V. 72. P. 281–283.
6. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. Москва: Наука, 1991. 271 с.
7. Плохинский Н.А. Биометрия. Москва: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
8. Grytsiniak I., Nagornyyuk T., Mariutsa A., Tarasjuk S. Analysis of genetic structure of Ukrainian scaled and framed carps of the Antoninsky-Zozulenets. *Czasopism naukowych informujemy, że wydawane przez Instytutu Zootechniki czasopismo «Roczniki Naukowe Zootechniki»* — Balice. Poland, 2013. T. 40, z. 2. P. 145–153.
9. Xiao T., Lu C., Xu Y. et al. Screening of SSR markers associated with scale cover pattern and mapped to a genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Appl. Genet.* 2015. May. 56(2). P. 269. doi: 10.1007/s13353-014-0250-9. Epub 2014 Oct 23.
10. Крась С.І., Городна О.В., Тарасюк С.І. Генетична диференціація популяцій амурського сазана ВАР «Сумирибгосп» та ВАР «Донрибкомбінат». *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини і біотехнології імені С. З. Гжицького*. 2010. Т. 12. № 3 (45). Ч. 3. С. 59–65.
11. Крась С.І., Стовбінський В.І., Боднар Г.І., Тарасюк С.І. Особливості генетичної структури амурського сазана. *Рибогосподарська наука України*. 2011. № 1. С. 62–67.
12. Fallahbagheri F., Pourkazemi M., Dorafshan S. Genetic analysis of wild common carp, *Cyprinus carpio* L. in the Anzali wetland, the Caspian Sea. *Iranian J. of Fisheries Sciences*. 2013. № 12(1). P. 1–11.
13. Крась С.І., Тарасюк С.І., Маріуца А.Е. Генетична характеристика стада амурського сазана (*Cyprinus carpio haematopterus*) рибогосподарства «Лісневичі». *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2011. № 4 (50). Т. 13. Ч. 3. С. 155–160.
14. Torres de Lemos C., Milan Rödel P., Regina Terra N. et al. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007. V. 66, Iss. 3. P. 391–401.
15. Kamel Ahmad, Jaber Salehl. Clastogenic studies on Tandaha Dam water in Asser. *Mediterranean Environment*. 2010. V. 16, № 1. P. 33–42.
16. Grytsiniak I., Glushko Y., Tarasjuk S. Cytogenetic profile of the Ukrainian carp. *Czasopism naukowych informujemy, że wydawane przez Instytutu Zootechniki czasopismo «Roczniki Naukowe Zootechniki»* — Balice. Poland, 2013. T. 40, z. 1. P. 45–53.
17. Галицкий В.А. Возникновение эукариотических клеток и происхождение апоптоза. *Цитология*. 2008. Т. 47. Вып. 2. С. 103–120.