

ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ ЦІННИХ ВИДІВ РИБ

Маріуца А. Е., Нагорнюк Т. А., Глушко Ю. М.

ВСТУП

Одними з основних чинників, що впливають на формування генетичної структури є фактори навколишнього середовища. Тому з метою встановлення особливостей формування генетичної структури цінних видів риб в екологічних умовах України було використано комплекс молекулярно– генетичних та цитогенетичних методів.

Використання молекулярно-генетичних методів для ідентифікації цінних видів риб на рівні популяцій є досить перспективним і для подальшого їх розвитку необхідна всебічна цільова державна підтримка, яка дасть можливість вирішити проблеми ідентифікації на молекулярному рівні.¹

На даному етапі опрацьовано новий метод аналізу і контролю генетичної структури, оснований на оцінці розподілу аельних варіантів одночасно за групами молекулярно-генетичних маркерів, а також на основі врахування асоціацій між ними. Оцінено відносно інформативність різноманітних засобів маркування особливостей генетичної структури. Показано, що поєднання аельних варіантів за різноманітними типами молекулярно-генетичних маркерів може бути використане як вдова характеристика.

Одним з найбільш ефективних інструментів у дослідженні генетичної структури є метод полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням міжмікросателітних ДНК маркерів (inter simple sequence repeats, ISSR). Метод може бути використаний для виявлення міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації видів, популяцій, а в деяких випадках для індивідуального генотипування.²

¹ Третяк О. М., Грициняк І. І., Тарасюк С. І. Використання ДНК-маркерів у дослідженні генетичної структури племінного матеріалу веслоноса (*Polyodon spathula* (Walb.)). *Рибогосподарська наука України*. 2012. № 4. С. 117–120.

² Курта Х. М., Малишева О. О., Бабенко В. І., Спиридонов В. Г. Особливості генетичної структури веслоноса (*Polyodon spathula*) Чернігівської популяції. *Біологія тварин*. 2018. Т. 20. № 2. С. 51–57. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/bitv_2018_20_2_8.)12,13.

³ Bielikova Olena, Mariutsa Alla, Mruk Antonina, Tarasjuk Serhii, Romanenko Viktoriia. Genetic structure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae) from aquaculture by DNA-markers. *Biosystems Diversity*. 2021. Vol. 29. Issue 1. P. 28–32. S and WoS. <http://doi.org/10.15421/012104>.

Міжмікросателітні ДНК маркери (inter simple sequence repeats, ISSR) можуть бути використані для виявлення міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації видів, популяцій, а в деяких випадках для індивідуального генотипування. Виходячи з отриманих результатів описана мінливість генетичної структури за конкретною ділянкою геному і розподіл маркерів у популяції свідчить про суттєвий рівень генетичної мінливості, що є підґрунтям для визначення рівня їх пристосованості в процесі штучного добору у господарствах. Обрані для вивчення поліморфізму локуси ДНК мають різний рівень інформативності, який характеризується кількістю алелів.³

Стабільний стан популяції риб значною мірою залежить від їх генетичної структури, проте в природних умовах на гомеостаз риб впливає цілий комплекс абіотичних та біотичних чинників, які індують у них всі три типи мутацій (генні, хромосомні, та геномні). Нажаль універсального методу детекції всіх порушень не існує, проте найбільш оптимальними є цитогенетичні підходи, зокрема мікроядерний тест та аналіз метафазних пластинок. Цитогенетичний контроль стану хромосомного апарату риб, його цілісність, наявність структурних та кількісних порушень є невід'ємною частиною генетичної експертизи племінних ресурсів риб, що в черговий раз обумовлює актуальність впровадження в практику цитогенетичних тестів, спрямованих на визначення характеру впливу екзогенних чинників на геном риб. В зв'язку з цим, з діагностичною і прогностичною метою виникає необхідність у проведенні досліджень, що спрямовані на виявлення геномної і хромосомної нестабільності різного походження.

Запропонований нами комплекс молекулярно-генетичних та цитогенетичних методів дасть можливість здійснювати спрямований вплив на формування генетичної структури цінних видів риб дозволить консолідувати популяції за рівнем гетерозиготності.

1. Особливості генетичної структури веслоноса (*Polyodon spathula*) з застосуванням трьох міжмікросателітних локусів (ISSR).

В умовах ринкової економіки існує необхідність розширення асортименту рибної продукції з впровадженням в аквакультуру найцінніших видів риб. Таким вимогам повною мірою відповідає завезений в нашу країну північноамериканський вид риб, єдиний серед представників ряду осетроподібних планктофаг – веслоніс (*Polyodon*

spathula).^{4,5} Даний вид поєднує споживчі та господарські характеристики, він є продуцентом дороговартісної осетрової продукції чорної ікри та делікатесного м'яса, за рахунок чого його культивування у штучних умовах є економічно обґрунтованим.^{6,7} Рационального використання ремонтно-маточних стад потребує розширення виробництва продукції веслоноса та проведення селекційних робіт з урахуванням особливостей генетичної структури популяції. Однією з основних причин, яка може вплинути на зниження генетичного різноманіття у штучних популяціях веслоноса, є низька чисельність вихідного племінного матеріалу для формування маточних стад, відсутність генетичного контролю та цілеспрямованої селекції при відтворенні даного виду.^{8,9,10}

Тому дослідження популяційно-генетичної структури господарсько-цінних об'єктів аквакультури має важливе значення для контролю за ефективністю селекційних робіт при їх штучному відтворенні.

Метою роботи було визначення особливостей генетичної структури веслоноса (**Polyodon spathula**) на основі інформативності ISSR маркерів.

Нами за допомогою міжмікросателітного ДНК-аналізу вперше отримані дані щодо особливостей генетичної структури веслоноса та загалом ідентифіковано 145 ISSR-PCR маркерів із яких інформативними є 87%.

Число ампліфікованих ISSR-PCR маркерів варіювало в залежності від праймера від 9 ампліконів (праймер (GAG)₆C та (AGC)₆G) до 14

⁴Третяк О. М., Тарасюк С. І. Аналіз генетичної структури груп веслоноса за окремими генетико-біохімічними системами. *Рибогосподарська наука України*. 2011. № 1. С. 50–57. *spathula*). *Biological Resources and Nature Management*. 2017. Vol. 9. N. 5–6. Available at:<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/9590>.

⁵Mims, S. Aquaculture of Paddlefish in the United States Aquat. *Living Resour.* 2001. V. 14. P. 391–398.

⁶Kurta K., Malysheva O., Grishyn B., Getia A., Shynkarenko L., Spirydonov V. Identification allelic variants of microsatellite DNA paddlefish (*Polyodon spathula*). *Biological Resources and Nature Management*. 2017. Vol. 9. N. 5–6. Available at:<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/9590>.

⁷Sharylo Y., Vdovenko N., Fedorenko M., Gerasymchuk V., Neboga G., Haydamaka L., Hakun I. *Contemporary aquaculture: from theory to practice*. A practical guide. Kyiv, Prostobook. 2016. 149 p.

⁸Pikitch E., Doukakis P., Lauck L., Chakrabarty P., Erickson D.L. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries*. 2005. V. 6. P. 233–265. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2005.00190.x.

⁹Malysheva O., Spirydonov V., Mosnyagul K., Shynkarenko L., Andreev I. Intraspecific polymorphism of the microsatellite DNA of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii brandt*). *Fishery science of Ukraine*. 2016. N. 4 (38). P. 123–130.

¹⁰Kaczmarczyk D., Luczynski M., Kolman R. Assemblage of spawning pairs of farmed American paddlefish based on their individual genetic profiles – a new tool in managing of the broodstock's gene pool. *Summary document of Aquaculture Europe*. 2008. P. 36–37.

ампліконів (праймер (AGC)₆C) (табл. 1). Двома основними параметрами, визначеними для цього, є гетерозиготність (H) і міра інформаційного поліморфізму (PIC), яка виявляє дискримінаційну здатність маркера, фактично залежить від числа відомих алелей і розподілу їх частот тим самим еквівалентна геномній різноманітності. В додаток до них є додаткові показники, за допомогою яких можна також визначити ефективність вибраної системи «праймер – маркер». Індекс інформаційного поліморфізму в наших дослідженнях був в діапазоні від 0,227 (AGC)₆G до 0,314 (AGC)₆C, з середнім значенням 0,256 (табл.1). ISSR-маркери демонструють середні значення, для доміантних маркерів $PIC \leq 0,5$. Ефективне мультиплексне співвідношення визначають як добуток загального числа поліморфних локусів (на праймер) і долі поліморфних локусів від їх загального числа.¹¹ Ефективне мультиплексне співвідношення варіювало в межах від 4,0 (AGC)₆G до 14,0 (AGC)₆C, що свідчило про найбільшу ефективність «праймер-маркерної системи» з використанням праймера (AGC)₆C (табл.1). Маркерний індекс (MI) – статистична величина, яка використовується для оцінки сумарної придатності маркерної системи (чим вище значення MI, тим краще для методики).¹²

В нашій роботі найбільше значення даного показника зафіксовано за локусом (AGC)₆C – 4,4, в той час, як найменше – за локусом (AGC)₆G – 0,9. Щоб відобразити здатність поєднання «праймер – прийнята методика» встановлюють відмінності між великим числом генотипів, використовують показник роздільна потужність (R_p).¹³

За нашими дослідженнями роздільна потужність була найменша з використанням праймеру (GAG)₆C – 7,2, а за праймерами (AGC)₆G – 10,8 та (AGC)₆C – 11,0. Найбільший процент поліморфних бендів є за маркером (AGC)₆C – 100 %, а найменший процент поліморфних бендів за маркером (AGC)₆G – 66,7%.

Найвищі показники PIC (0,314), EMR (14), MI (4,4), PPB(100,0) та R_p (11) були зафіксовані за маркером (AGC)₆C, для встановлення відмінностей серед особин вибірки, що свідчило про найбільшу ефективність даного маркеру (рис.1). За трьома маркерами молекулярна маса ампліфікованих фрагментів була в діапазоні від 125 до 1470 п.н.

¹¹ Chesnokov Y. V., Artemyeva A. M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015. V. 50(5). P. 571–578. DOI:<https://doi.org/10.15389/agrobiology.5.571eng>.

¹² Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999. V. 98(1). P. 107–112. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051046>.

¹³ Nagaraju J., Damodar Reddy K., Nagaraja G. M., Sethuraan B. N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*. 2001. V. 86. P. 588–597. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00861.x).

(табл. 1). Найменш вузький діапазон ампліконів був отриманий за локусом (AGC)₆G і становив від 215 до 1275 п.н. За локусами (GAG)₆C та (AGC)₆C спостерігались більш ширші спектри ампліконів які знаходились в межах 215-1265 п.н. та 320-1470 п.н.

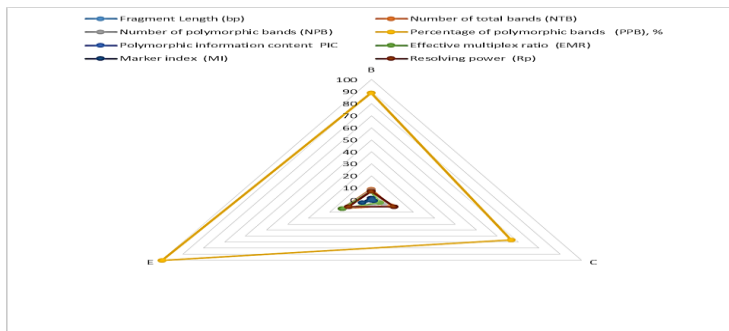


Рис 1. Показники генетичного поліморфізму за ISSR-маркерами

Примітка: NTB – загальна кількість амплікованих фрагментів (no. of total bands), NPB – кількість поліморфних фрагментів (no. of polymorph bands), PPB – процент поліморфних бендів (percentage of polymorphic bands), PIC – Індекс інформаційного поліморфізму, EMR – ефективне мультиплексне співвідношення (Effective multiplex ratio), MI – маркерний індекс, R_p – роздільна потужність.

Таблиця 1

Частота алелів за ISSR-маркерами у досліджених груп веслоноса

(GAG) ₆ C		(AGC) ₆ G		(AGC) ₆ C	
Розмір амплікону, п.н.	Частота алельних варіантів (%)	Розмір амплікону, п.н.	Частота алельних варіантів (%)	Розмір амплікону, п.н.	Частота алельних варіантів (%)
1275	2,8	1265	3,7	1470	3,6
1175	2,8	1190	7,4	1405	7,3
1085	27,7	645	9,3	1375	3,6
975	2,8	615	5,6	1055	3,6
745	16,6	540	7,4	1015	5,5
725	11,1	485	11,1	985	7,3
375	8,3	395	18,5	835	7,3
275	22,2	245	18,5	815	9,0
215	5,5	125	18,5	735	3,6
				690	7,3
				655	11,0
				530	3,6
				380	16,3
				320	11,0

Наявність мономорфних бендів встановлено, за маркером (AGC)₆G виявлено три фрагменти розміром 125, 245 та 395 п.н, за маркером В фрагмент 1085 п.н. Мономорфні бенди в прийдешньому можна застосовувати для міжвидових порівнянь різних видів та встановлення походження зразків.

З високою частотою більше 40 %, зустрічалися бенди, які дали змогу продемонструвати специфіку генетичної структури веслоноса за обраними ISSR-маркерами, а також обрані маркери дають змогу охарактеризувати біорізноманіття та оцінити стан генетичної структури веслоноса.

2. Аналіз генетичної структури райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) за біохімічними системами

Дослідження ферментних систем у риб, як генетичних маркерів, дозволяє спостерігати за аельною мінливістю та гетерогенністю популяції в межах виду. Такі роботи з вивчення біохімічного поліморфізму українських популяцій райдужної форелі є фрагментарними та не повністю дослідженими.^{14,15}

З метою збереження та оцінки генетичних ресурсів та з'ясування популяційно-генетичного стану проведено аналіз генетичної структури райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* W.) з використанням біохімічних маркерів – локусів естерази (EST; 3.1.1.1), карбоангідрази (CA; 4.2.1.1), ізоцитратдегідрогенази (IDH; 1.1.1.41), супероксиддисмутази (SOD; 1.15.1.1).¹⁶

У райдужної форелі показано особливості розподілу швидко- (F) та повільноігруючих (S) алельних варіантів досліджуваних локусів (рис. 2).

Відхилення частот генотипів (g_o) від теоретично очікуваних (g_e) оцінювали за критерієм Пірсона. Генотиповий склад локусів біохімічних систем у райдужної форелі представлений надлишком особин з гетерозиготними генотипами FS за локусами SOD ($g_o=78$; $g_e=57,7$; $\chi^2=14,3$, $P<0,001$), EST ($g_o=74$; $g_e=56$; $\chi^2=11,8$, $P<0,01$) та CA ($g_o=76$; $g_e=57,7$; $\chi^2=11,6$, $P<0,01$). За локусом IDH не відмічалось статистично достовірних відмінностей за кількістю виявлених особин з

¹⁴ Mendrishora P., Nagornjuk T., Tarasjuk S. Peculiarities of the genetic structure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) groups at the fish farm «Sloboda Banilov», Chernivtsi region. *Рибгосподарська наука України*. 2016. № 2. С. 65–72. DOI: 10.15407/fsu2016.02.065.

¹⁵ Bielikova O. Yu., Tarasjuk S. I., Mruk A. I., Nahorniuk T. A., Buchatskyi L. P. Assessment of genetic structure variability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) of Ukrainian local stocks using polymorphic blood plasma proteins. *Biotechnologia Acta*. 2021. V. 14. N 2. P. 37–46. DOI: 10.15407/biotech14.02.037.

¹⁶ Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C., Whitt G. S. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1990. V. 119. P. 2–15.

генотипом FS ($g_0=66$) і очікуваними ($g_e=57,4$) гетерозиготними генотипами.

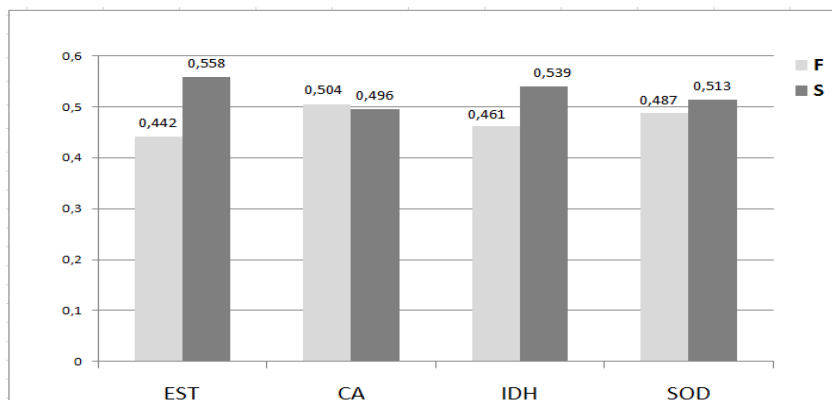


Рис. 2. Розподіл частоти алелів у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* W.)

На діаграмі подано розподіл фактичних і очікуваних генотипів (FF, FS, SS) за дослідженими локусами у райдужної форелі у відсотковому співвідношенні (рис. 3).

Для характеристики рівня генетичної мінливості обчислювали фактичну (H_0) та очікувану (H_e) гетерозиготність (рис. 4).

Встановлено високий рівень гетерозиготності за локусом *SOD* $H_0 = 67,8\%$, порівняно з очікуваним значенням $H_e = 50,2\%$, $P < 0,001$.

Рівень середньої фактичної ($H_0 = 64,2\%$) гетерозиготності переважав очікуваний ($H_e = 50\%$), що дозволяє стверджувати про достатній рівень гетерогенності дослідженої популяції райдужної форелі.

Величина індексу фіксації F_{is} за всіма локусами становила від $-0,155$ за локусом IDH до $-0,357$ за локусом SOD. Середнє значення індексу фіксації ($F_{is} = -0,29$) свідчило про відсутність суттєвого впливу інбридингу на генетичну структуру особин у складі вибірки.

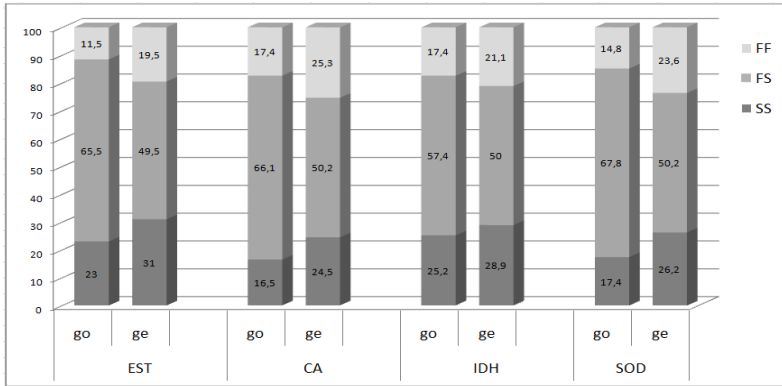


Рис. 3. Розподіл фактичних (g_o) і очікуваних (g_e) генотипів за локусами біохімічних систем у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* W.), %

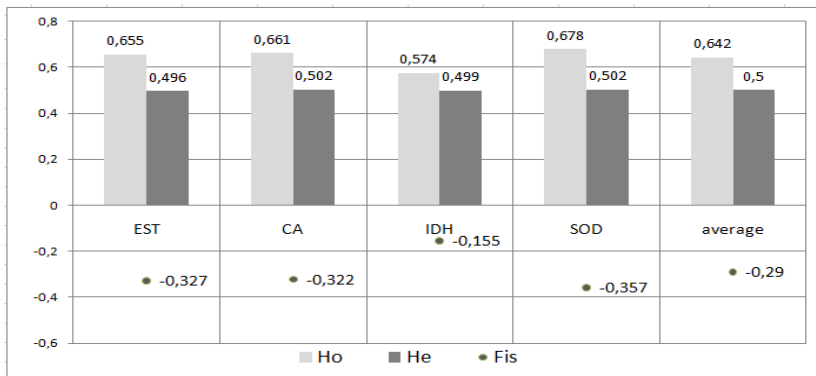


Рис. 4. Рівень фактичної (H_o), очікуваної (H_e) гетерозиготності та індекс фіксації Райта (Fis) у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss* W.)

3. Цитогенетична характеристика цінних видів риб

Метою даного напрямку досліджень було провести оцінку та порівняльний аналіз рівня дестабілізації хромосомного апарату локальних стад цінних видів риб України, за використання цитогенетичних підходів.

Мікроядерний тест – цитогенетичний метод, який дозволяє оцінити частоту мікроядер індукованих фізичними, хімічними та біологічними мутагенами. Даний тест – один із найпростіших, надійних та доступних скринінг систем для визначення дії, як кластогенних, так і для

анеугенних агентів¹⁷. Формування мікроядер може відбуватися в клітинах будь-якої тканини організму здатних до поділу¹⁸. Розвиток методів біологічного моніторингу з використанням риб дає можливість перевірити ступінь забруднення водойми і дати швидко відповідь про фізіологічний стан риб за низьких концентрацій мутагенів прямої дії у водоймах.

Мікроядра можуть формуватися із фрагментів хромосом, які виникли в результаті структурних порушень хромосом і не були включені в новосформоване ядро під час клітинного поділу та з цілих хромосом і не були включені в дочірнє ядро. Показники обліку мікроядер відображають результати кластогенної дії (порушення структури хромосом) на хромосоми сполук, що вивчаються¹⁹.

Результати цитологічних досліджень мікроядер показали, що вони, як правило, сформовані з гетерохроматину, на основі чого було висунуто припущення, що немітотичний механізм утворення мікроядер є шляхом видалення з ядра генетично дефектного хроматину. Тобто мікроядерний тест – це метод оцінки дестабілізації генетичного апарату, який включає частину типів хромосомних аберацій та варіанти анеуплоїдії клітин^{20,21}.

На сьогоднішній день аналіз визнаний як один з найуспішніших і надійних тестів для визначення впливу генотоксичнів прямої та опосередкованої дії на живі організми²².

Кровотворна система риб дуже чутлива до змін стану водного середовища. Переваги мікроядерного тесту для скринінгу мутагенних ефектів водного середовища були добре вивчені на різних системах риб таких як: периферійна кров, зяберні дуги, селезінка, печінка, спинний мозок, тимус²³. За частотою еритроцитів з мікроядрами у риб виявляються видові, сезонні і локальні відмінності. В літературі

¹⁷ Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res (Genet Toxicol EM)*. 1998. V. 415. P. 167–184.

¹⁸ Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M. [et al.]. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1991. V. 18. Iss. 4. P. 277–291.

¹⁹ Migliore L., Barale R., Bulluomini D. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamycin and vincristine a comparison between micronucleus and chromosomal aberration assays. *Toxicol. In vitro*. 1997. № 2. P. 247–254.

²⁰ Ковальова О. А., Грициняк І. І. Цитогенетичні дослідження риб. *Рибогосподарська наука України*. 2009. № 1. С. 48–53.

²¹ Bickham J. W., Sandhu S. S., Hebert P. D. N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res*. 2000. V. 463. P. 33–51.

²² Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S. *In vitro* genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*. 1998. V. 130(2-3). P. 129–139. doi: 10.1016/s0300-483x(98)00097-3.

²³ Andrade V. M., Silva J., Silva F. R., Heuser V. D., Dias J. F., Yoneama M. L., Freitas T. R. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen*. 2004. V. 44(5). P. 459–468.

накопичено достатня кількість даних з оцінки стану різних видів риб в залежності від умов водного середовища за допомогою мікроядерного тесту. Ліміти цього показника у межах 0,1–3,8‰ вказують на задовільну оцінку стабільності хромосомного апарата риб. На сьогоднішній день, мікроядерний тест на рибах широко використовується в країнах світу таких як: Туреччина, Німеччина, Молдова та Польща ²⁴.

На сьогоднішній день, в Україні активно розвивається форелівництво, основним об'єктом якого є райдужна форель (*Oncorhynchus mykiss*). Для дослідження рівня соматичного мутагенезу виконували мікроядерний тест в клітинах периферійної крові трирічок райдужної форелі господарств ТОВ «Ішхан» та ТОВ «Слобода Банилів» Чернівецької обл. та веслоноса ДПДГ «Нивка» Київської обл.

Для встановлення рівня геномних порушень райдужної форелі було виконано цитогенетичний аналіз даних риб, вирощених в умовах залізобетонних басейнів ТОВ «Ішхан» Чернівецької обл.

Мікроядерний тест та аналіз частот апоптозів виконували в клітинах периферійної крові райдужної форелі. Результати проведених досліджень наведено в табл. 2.

Таблиця 2

**Частота цитогенетичних показників
у клітинах периферійної крові райдужної форелі**

№ п/п	№ проби	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
1	1	2	-	-	4
2	2	3	-	-	2
3	3	2	3	1	3
4	4	1	1	1	2
5	6	1	-	-	4
6	7	1	-	-	4
7	8	2	1	1	3
8	10	2	1	1	4
9	12	2	-	2	3
10	13	1	1	1	3
11	14	2	1	-	4
12	16	1	1	2	2
13	17	2	2	1	3
14	19	1	2	-	3
15	20	2	2	1	2
Середнє		1,7±0,2	1,0±0,2	0,7±0,2	3,1±0,2

²⁴ Tolga Cavas, Serap Ergene-Gozukara. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2005. V. 46. № 1. P. 64–70.

Результати цитогенетичного аналізу показали, що досліджувана група райдужної форелі характеризується відносно не високим рівнем еритроцитів з мікроядрами ($1,7 \pm 0,2\%$) та низькою частотою лімфоцитів з мікроядрами ($1,0 \pm 0,2\%$) та двуюдерних лімфоцитів ($0,7 \pm 0,2\%$). В свою чергу підвищений рівень апоптозів ($3,1 \pm 0,2\%$) в групі райдужної форелі може бути результатом елімінації мутантних лімфоцитів даним шляхом.

Сумарне значення генетично дефектних лімфоцитів становило ($1,7 \pm 0,2\%$), що свідчить про відсутність екзогенно тиску на імунну систему риб та сприятливі умови існування.

На рівень цитогенетичних показників впливають не лише екзогенні чинники, але і видова приналежність та вік об'єктів досліджень. Тому з метою виключення впливу даних чинників було виконано аналогічні дослідження в локальному стаді трирічок райдужної форелі вирощеному в умовах залізобетонних басейнів ТОВ «Слобода Банилів» Чернівецької обл. (рис. 5).

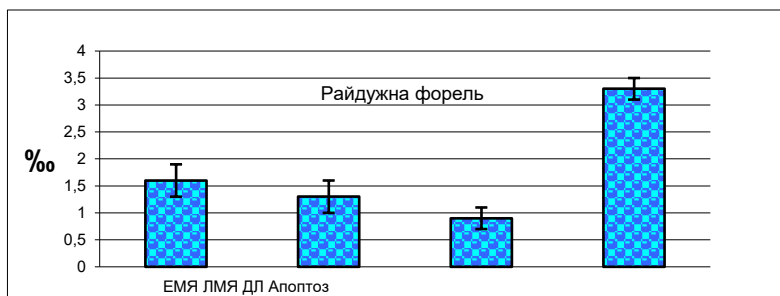


Рис. 5. Рівень цитогенетичних показників райдужної форелі

За результатами цитогенетичного аналізу встановлено, що досліджувана група райдужної форелі характеризується також відносно не високим рівнем еритроцитів з мікроядрами ($1,6 \pm 0,3\%$) та лімфоцитів з мікроядрами і двуюдерних лімфоцитів. Підвищена частота апоптозів в даній групі ($3,3 \pm 0,2\%$) на нашу думку також свідчить про елімінації мутантних лімфоцитів даним шляхом. Статистично вірогідних міжгрупових відмінностей за цитогенетичними показниками виявлено не було.

З метою перевірки інформативності цитогенетичних маркерів для оцінки видоспецифічної генетичної гетерогенності виконували мікроядерний тест на прикладі племінних стад веслоноса ДПДГ «Нивка» Київської обл. та райдужної форелі ТОВ «Ішхан» Чернівецької обл. відібраних в один і той же час (рис. 6).

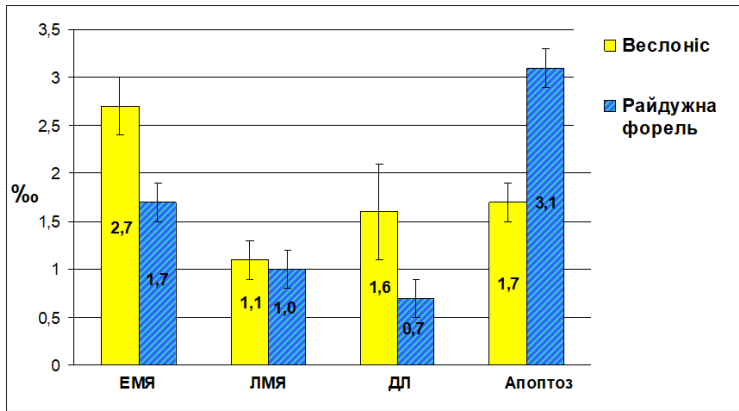


Рис. 6. Рівень цитогенетичних показників веслоноса та райдужної форелі

Встановлено, що група веслоноса статистично вірогідно характеризується вищим рівнем цитогенетичних показників за частотою ЕМЯ ($P < 0,05$) та ДЛ ($P < 0,05$). За кількістю мікроядерних лімфоцитів групи практично не відрізнялись. В свою чергу райдужна форель статистично вірогідно характеризується вищим рівнем апоптозів ($P < 0,005$), що можливо пояснюється елімінацією мутантних клітин у даних риб шляхом апоптозу.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених молекулярно-генетичних та цитогенетичних досліджень цінних видів риб були встановлені наступні особливості їх генетичної структури.

В представленій роботі ми показали, що міжмікросателітний ДНК аналіз (ISSR– PCR маркери) ефективний при вивченні генетичної структури і молекулярно-генетичної ідентифікації популяції веслоноса, що необхідно для формування ремонтно – маточних стад, в яких відбувається штучне відтворення з подальшим випуском молоді в популяцію з ідентичним генфондом. Загалом наші дослідження та дані отримані, при застосуванні різних маркерів, свідчить про те, що в дослідженій групі веслоноса існують суттєві відмінності. Вперше отримані дані щодо особливостей генетичної структури веслоноса та загалом ідентифіковано 145 ISSR– PCR маркерів із яких інформативними є 87%. Найвищі показники PIC (0,314), EMR (14), MI (4,4), PPB(100,0) та R_p (11) були зафіксовані за маркером (AGC)6C, для встановлення відмінностей серед особин вибірки, що свідчило про найбільшу ефективність даного маркеру. Показники демонструють

рівень інформативності та ефективності обраних маркерів для аналізу генетичної структури веслоноса.

Наявність мономорфних бендів встановлено, за маркером (AGC)₆G виявлено три фрагменти розміром 125, 245 та 395 п.н, за маркером В фрагмент 1085 п.н. Мономорфні бенди в подальшому можна застосовувати для міжвидових порівнянь різних видів та встановлення походження зразків.

Отримані дані будуть використовуватися у подальшій аналітичній обробці для оцінки популяційно – генетичної структури дослідженої групи веслоноса.

Таким чином, результати проведених досліджень генетичної структури райдужної форелі за окремими біохімічними системами вказували на високий рівень гетерозиготності досліджуваної популяції райдужної форелі, який в середньому становив 64,2%. Спостерігався невривноважений стан генетичної структури райдужної форелі через надлишок гетерозиготних особин за локусами SOD ($P < 0,001$), EST ($P < 0,01$) і SA ($P < 0,01$), що підтверджувалось також від'ємним значенням індексу фіксації ($F_{is} = -0,29$).

Результати цитогенетичного аналізу в двох групах райдужної форелі показали, що вони характеризуються відносно не високим рівнем еритроцитів з мікроядрами ($1,7 \pm 0,2\%$) та ($1,6 \pm 0,3\%$) та низькою частотою лімфоцитів з мікроядрами та двуядерних лімфоцитів. В свою чергу підвищений рівень апоптозів в обох групах райдужної форелі може бути результатом елімінації мутантних лімфоцитів даним шляхом.

Встановлено, що група веслоноса статистично вірогідно характеризується вищим рівнем ЕМЯ ($P < 0,05$) та ДЛ ($P < 0,05$) порівняно з групою райдужної форелі. В свою чергу, райдужна форель статистично вірогідно характеризується вищим рівнем апоптозів ($P < 0,005$).

Таким чином, в результаті проведених цитогенетичних досліджень встановлено, що для об'єктивної оцінки генетичної гетерогенності племінних стад веслоноса та райдужної форелі необхідно враховувати порушення в клітинах як еритроцитарного, так і лейкоцитарного ряду.

Даний напрям досліджень заслуговує на подальший розвиток, що дасть змогу отримати більш повну інформацію щодо мінливості генетичної структури цінних видів риб.

АНОТАЦІЯ

Проведені молекулярно-генетичні та цитогенетичні дослідження цінних видів риб з різних регіонів відтворення, що характеризуються особливостями їх генетичної структури.

Вивчено особливості генетичної структури веслоноса ідентифіковано 145 ISSR– PCR маркерів із яких інформативними є 87%. Найбільш інформативним є маркер (AGC)₆C, що було визначено за показниками PIC (0,314), EMR (14), MI (4,4), PPB(100,0) та R_p (11). Наявність мономорфних бендів встановлено, за маркером (AGC)₆G виявлено три фрагменти розміром 125, 245 та 395 п.н, за маркером В фрагмент 1085 п.н. Мономорфні бенди в подальшому можна

застосовувати для міжвидових порівнянь різних видів та встановлення походження зразків.

Результати характеристики генетичної структури райдужної форелі з використанням біохімічних систем дозволяє оцінювати особливості динаміки генофондів у відповідь на дію факторів природного і штучного відборів. Значення фактичного рівня середньої гетерозиготності ($H_o=64,2\%$), який переважав очікуваний рівень ($H_e=50\%$), вказувало на високий рівень генетичної мінливості райдужної форелі. Від'ємне значення показника інбридингу F_{is} свідчило про 29% надлишок гетерозигот у дослідженому стаді райдужної форелі.

В роботі здійснено аналіз специфіки формування цитогенетичних показників цінних видів риб в залежності від видової приналежності та умов розведення. Встановлено, що дві групи райдужної форелі господарств ТОВ «Ішхан» та ТОВ «Слобода Банилів» Чернівецької обл. характеризуються відносно не високим рівнем еритроцитів з мікроядрами, лімфоцитів з цитогенетичними порушеннями. Показано, що група веслоноса статистично вірогідно характеризується вищим рівнем ЕМЯ ($P<0,05$) та ДЛІ ($P<0,05$) порівняно з групою райдужної форелі. В свою чергу, райдужна форель статистично вірогідно характеризується вищим рівнем апоптозів ($P<0,005$).

Література

1. Третяк О. М., Грициняк І. І., Тарасюк С. І. Використання ДНК-маркерів у дослідженнях генетичної структури племінного матеріалу веслоноса (*Polyodon spathula* (Walb.)). *Рибогосподарська наука України*. 2012. № 4. С. 117–120.
2. Курта Х. М., Малишева О. О., Бабенко В. І., Спиридонов В. Г. Особливості генетичної структури веслоноса (*Polyodon spathula*) Чернігівської популяції. *Біологія тварин*. 2018. Т. 20. № 2. С. 51–57. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/bitv_2018_20_2_8.)12,13.
3. Bielikova Olena, Mariutsa Alla, Mruk Antonina, Tarasjuk Serhii, Romanenko Viktoria. Genetic structure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae) from aquaculture by DNA-markers. *Biosystems Diversity*. 2021. Vol. 29. Issue 1. P. 28–32. S and WoS. <http://doi.org/10.15421/012104>.
4. Третяк О. М., Тарасюк С. І. Аналіз генетичної структури груп веслоноса за окремими генетико-біохімічними системами. *Рибогосподарська наука України*. 2011. № 1. С. 50–57.
5. Mims, S. Aquaculture of Paddlefish in the United States *Aquat. Living Resour.* 2001. V. 14. P. 391–398.
6. Kurta K., Malysheva O., Grishyn B., Getia A., Shynkarenko L., Spirydonov V. Identification allelic variants of microsatellite DNA paddlefish (*Polyodon spathula*). *Biological Resources and Nature Management*. 2017. Vol. 9. N. 5–6. Available at: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/9590>.

7. Sharylo Y., Vdovenko N., Fedorenko M., Gerasymchuk V., Neboga G., Haydamaka L., Hakun I. *Contemporary aquaculture: from theory to practice*. A practical guide. Kyiv, Prostobook. 2016. 149 p.

8. Pikitch E., Doukakis P., Lauck L., Chakrabarty P., Erickson D.L. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries*. 2005. V. 6. P. 233–265. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2005.00190.x.

9. Malysheva O., Spyridonov V., Mosnyagul K., Shynkarenko L., Andreev I. Intraspecific polymorphism of the microsatellite DNA of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii brandt*). *Fishery science of Ukraine*. 2016. N. 4 (38). P. 123–130.

10. Kaczmarczyk D., Luczynski M., Kolman R. Assemblage of spawning pairs of farmed American paddlefish based on their individual genetic profiles – a new tool in managing of the broodstock's gene pool. *Summary document of Aquaculture Europe*. 2008. P. 36–37.

11. Chesnokov Y. V., Artemyeva A. M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 2015. V. 50(5). P. 571–578. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiol.5.571eng>.

12. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999. V. 98(1). P. 107–112. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051046>.

13. Nagaraju J., Damodar Reddy K., Nagaraja G. M., Sethuraan B. N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*. 2001. V. 86. P. 588–597. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00861.x).

14. Mendrisha P., Nagornjuk T., Tarasjuk S. Peculiarities of the genetic structure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) groups at the fish farm «Sloboda Banilov», Chernivtsi region. *Рибогосподарська наука України*. 2016. № 2. С. 65–72. DOI: 10.15407/fsu2016.02.065.

15. Bielikova O. Yu., Tarasjuk S. I., Mruk A. I., Nahorniuk T. A., Buchatskyi L. P. Assessment of genetic structure variability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) of Ukrainian local stocks using polymorphic blood plasma proteins. *Biotechnologia Acta*. 2021. V. 14. N 2. P. 37–46. DOI: 10.15407/biotech14.02.037.

16. Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C., Whitt G. S. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1990. V. 119. P. 2–15.

17. Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res (Genet Toxicol EM)*. 1998. V. 415. P. 167–184.

18. Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M. [et al.]. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1991. V. 18. Iss. 4. P. 277–291.

19. Migliore L., Barale R., Bulluomini D. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamycin and vincristine: a comparison between micronucleus and chromosomal aberration assays. *Toxicol. In vitro*. 1997. № 2. P. 247–254.

20. Ковальова О. А., Грициняк І. І. Цитогенетичні дослідження риб. *Рибогосподарська наука України*. 2009. № 1. С. 48–53.

21. Bickham J. W., Sandhu S. S., Hebert P. D. N., Chikhi L., Athwal R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 2000. V. 463. P. 33–51.

22. Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S. *In vitro* genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*. 1998. V. 130(2-3). P. 129–139. doi: 10.1016/s0300-483x(98)00097-3.

23. Andrade V. M., Silva J., Silva F. R., Heuser V. D., Dias J. F., Yoneama M. L., Freitas T. R. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 2004. V. 44(5). P. 459–468.

24. Tolga Cavas, Serap Ergene-Gozukara. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2005. V. 46. № 1. P. 64–70.

Information about the authors:

Mariutsa Alla Erhashivna,

Candidate of Agricultural Sciences,
Senior Research Scientist,

Head of the Laboratory of Genetics Investigation
Institute of Fisheries of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine

135, Obukhivska str., Kyiv, 03164, Ukraine

Nahorniuk Tetiana Andriivna,

Candidate of Agricultural Sciences, Senior Research Scientist,
Leading Research Scientist

Institute of Fisheries of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine

135, Obukhivska str., Kyiv, 03164, Ukraine

Hlushko Yuliia Mykolaivna,

Candidate of Agricultural Sciences,
Senior Research Scientist

Institute of Fisheries of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine

135, Obukhivska str., Kyiv, 03164, Ukraine