

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧУБИК ІННА ЮХИМІВНА

УДК 594.124:577.2:577.15

ДИСЕРТАЦІЯ
ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
***MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARCK, 1819) В ПІВНІЧНО-**
ЗАХІДНІЙ ЧАСТИНІ ЧОРНОГО МОРЯ

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ І. Ю. Чубик

Науковий керівник: Чеботар Сабіна Віталіївна, доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН України

Одеса – 2023

АНОТАЦІЯ

Чубик І. Ю. Генетико-біохімічні характеристики *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в північно-західній частині Чорного моря. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, 2023.

Дисертація присвячена встановленню за допомогою молекулярно-генетичного аналізу видової приналежності особин мідій в північно-західній частині Чорного моря (ПЗЧМ) з використанням молекулярного маркера *Me 15-16*, розробленого до неповторювальної області гена *Fp1* адгезивного білка *Mefp-1* мідії; вивченню генетичного різноманіття та структури популяції угруповань мідій за допомогою мікросателітних (МС) маркерів; дослідженню поліморфізму і тканинного розподілу захисних ензимів, що захищають організми двостулкових молюсків від різних несприятливих впливів.

Вперше за допомогою молекулярно-генетичного аналізу доведено видову приналежність поселень мідій в ПЗЧМ, проаналізовано генотипи мідій, виловлених в шести локаціях ПЗЧМ. Вибірki з ПЗЧМ порівнювали з генотипами мідій з Балтійського моря, Північного моря та з Ватового моря. Молекулярно-генетичними дослідженнями доведено, що угруповання мідій з шести локацій ПЗЧМ складаються виключно з особин *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Спростована гіпотеза с.н.с., д.б.н. Н. М. Шурової (2009, 2013) про присутність близькоспоріднених мідій виду *M. trossulus* і *M. edulis* та їх гібридів з *M. galloprovincialis* в досліджених локаціях Чорного моря. Проте, було підтверджено наявність гібридизації між видами *M. trossulus* і *M. edulis* у Балтійському морі та видів *M. edulis* і *M. galloprovincialis* – у Північному і Ватовому морях.

Проведено порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей «варіабельної області» генів адгезивного білка ноги мідій роду *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*) представлених в базі даних GenBank, що сприяє розумінню наявності поліморфізмів дослідженої ділянки геному й аргументує можливість подальшого застосування молекулярного маркера *Me 15-16* для диференціації генотипів чотирьох видів двостулкових молюсків. Біоінформатичним аналізом нуклеотидних послідовностей «варіабельної області» генів адгезивного білка доведено наявність у досліджуваній області мутацій, які дозволяють розрізняти між собою чотири види з представників роду *Mytilus*. За даними виконаного філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей ділянки гена *Fp1*, визначено більшу спорідненість виду *M. galloprovincialis* з видами *M. trossulus*, *M. edulis* та *M. chilensis*, ніж з *M. californianus* і *M. coruscus*. З використанням методів біоінформатики було проведено аналіз первинної і вторинної структури адгезивного білка *M. galloprovincialis* та побудовано моделі його тривимірної структури.

В роботі вперше за допомогою мікросателітного аналізу проаналізовано генетичне різноманіття та генетичну структуру популяції для низки угруповань мідій з ПЗЧМ. Для порівняння алельних характеристик за досліджуваними МС-локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*), отриманими для чорноморської мідії *M. galloprovincialis*, були також проаналізовані інші види мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів. Показано достовірні відмінності за частотами алелів МС-локусів між досліджуваними вибірками мідій. Встановлено дефіцит гетерозиготних генотипів серед досліджуваних молюсків ПЗЧМ та низькі рівні генетичної диференціації між досліджуваними угрупованнями мідій. Виявлено високу генетичну подібність між угрупованнями мідій з Чорного моря, порівняно з угрупованнями мідій Балтійського, Північного та Ватового морів.

В дисертаційній роботі представлено результати визначення тканиннспецифічного профілю набору ензимів, що забезпечують антиоксидантний захист та біотрансформацію ксенобіотиків у двостулкових молюсків. В п'яти органах мідій (гепатопанкреас, ктенідії, мантия, нога, мускул-

аддуктор) з Чорного моря було досліджено білковий поліморфізм, показано ізоалозимний тканинний розподіл захисних ензимних систем та скоординовану діяльність цих систем в органах-мішенях мідій. Вперше описано метод виявлення на електрофореграмах ізоформ ензимів антиоксидантної системи – пероксиредоксинів (PRX, КФ 1.11.1.15), які відіграють важливу роль у захисті організму від окисного стресу (Тортіков et al., 2022). Розглянуто можливість використання ензимів як біохімічних маркерів для генетичної диференціації угруповань мідій та зроблено висновки на користь застосування ДНК-маркерів.

Ключові слова: двостулкові молюски, мідії, *Mytilus galloprovincialis*, поліморфізм, різноманіття, генетична структура, молекулярно-генетичний аналіз, ізо-алозимний аналіз, молекулярні маркери, мікросателітні локуси (SSR), ПЛР, ензими антиоксидантної системи, ензими біотрансформації, біоінформатичні методи.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Чубик І. Ю., Чеботар С. В.** Мікросателітний аналіз генетичного різноманіття мідій північно-західного регіону Чорного моря. *Гідробіологічний журнал*. 2023. Т. 59, № 5. С. 59-75. URL: http://www.hydrobiolog.com.ua/2023/pdf_2023_5/chubik_4.pdf (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).
2. **Чубик І. Ю., Чеботар С. В.** Біоінформатичний аналіз генів адгезивного білка стопи мідій роду *Mytilus*. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 2022. Т. 27, вип. 2 (51). С. 30-43. DOI: [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2\(51\).268553](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2(51).268553) (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

3. Toptikov V. A., **Chubyk I. Y.**, Chebotar S. V. Distribution and polymorphism of enzymes involved in antioxidant protection and xenobiotics biotransformation in the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2022. Vol. 94, no. 4. P. 67-82. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj94.04.067> (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних).
4. **Chubyk I.**, Chebotar G., Bick A., Chebotar S. Species affiliation of the North-Western region of the Black Sea mussels based on the results of molecular-genetic analysis. *Hydrobiological Journal*. 2022. Vol. 58, no. 3. P. 68-75. DOI: <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v58.i3.60>
Чубик І. Ю., Чеботар Г. О., Бік А., Чеботар С. В. Видова приналежність мідій північно-західного регіону Чорного моря за результатами молекулярно-генетичного аналізу. *Гідробіологічний журнал*. 2022. Т. 58, № 1. С. 71-80. URL: http://www.hydrobiolog.com.ua/2022/pdf_2022_1/chubik_6.pdf
(Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті).

Матеріали та тези доповідей конференцій:

1. **Chubyk I.**, Chebotar S. Genetic and biochemical analysis of groups of mussels from the Black Sea. *Natural sciences in the dialogue of generations: proceedings of the national conference with international participation, Chisinau, Republic of Moldova, 14-15 September 2023*. Chisinau: CEP USM, 2023. P. 224-225.
2. **Chubyk I.**, Kvach Y., Chebotar S. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel settlements from the North Sea. *IV International Agricultural, Biological and Life Science Conference: poster presentation and conference proceedings*, Edirne, Turkey, 29-31 August 2022. Edirne: Trakya University, 2022. P. 115-116.
3. **Chubyk I. Yu.**, Toptikov V. A., Chebotar S. V. Analysis of biochemical polymorphism of Mediterranean mussels from the Black Sea. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation:*

- conference proceedings, Kyiv, Ukraine, 15-17 June 2022. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 2022. P. 77.
4. **Chubyk I. Yu.**, Stadnichenko S. V., Chebotar S. V. Polymorphism in *Me15 / Me16* and microsatellite loci of populations *Mytilus galloprovincialis* of North-western region of Black Sea. *The Importance of G. Gamow's Ideas for Biology of the 21st Century*: oral presentation and theses at the Biological Session of Conference named by G. A. Gamow, Odesa, Ukraine, 17 August 2021. Вісник ОНУ. Біологія. 2021. Т. 26, вип. 2(49). С. 126. DOI: [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2021.2\(49\).246982](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2021.2(49).246982).
 5. **Chubyk I. Yu.**, Chebotar S. V. Molecular genetic studies of mussels for use in aquaculture. *Marine ecosystems: research and innovations*: oral presentation and theses at the international scientific conference, Odesa, Ukraine, 27-29 October 2021. Odesa-Istanbul, 2021. P. 19.
 6. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Генетична диференціація мідій роду *Mytilus* північно-західної частини Чорного моря. *Challenges, threats and developments in biology, agriculture, ecology, geography, geology and chemistry*: proceedings of the international scientific and practical conference, Lublin, Republic of Poland, 2-3 July 2021. Lublin: Baltija Publishing, 2021. P. 128-131. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-111-4-30>.
 7. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Аналіз генетичного поліморфізму *Mytilus galloprovincialis* Lam. з метою використання в аквакультурі. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матеріали I Міжнародній наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 25 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 339-341.
 8. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Мікросателітний аналіз угруповань мідій з різних акваторій Чорного моря. *Іноватика в сучасній освіті та науці: теорія і практика*: матеріали II наук.-практ. конф., м. Ужгород, 25-26 вересня 2020 р. Херсон: Молодий вчений, 2020. С. 24-26.

SUMMARY

Chubyk I. Yu. Genetic and biochemical characteristics of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) in the North-Western part of the Black Sea. – Manuscript.

Thesis of the degree of PhD, specialty 091 «Biology». – Odesa I. I. Mechnikov National University. Odesa, 2023.

The thesis is devoted to establishing the species identity of mussel individuals in the North-Western part of the Black Sea (NWBS) using molecular genetic analysis with applying the *Me 15-16* molecular marker developed for the non-repetitive region of the *Fp1* gene of the adhesive protein Mefp-1 of mussels; study of genetic diversity and population structure of mussel communities using microsatellite (MS) markers; study of polymorphism and tissue distribution of protective enzymes that protect bivalve mollusk organisms from various adverse effects.

For the first time, molecular genetic analysis was used to prove the species affiliation of mussel settlements in the NWBS. The genotypes of mussels caught in six locations of the NWBS were analyzed. Samples from the NWBS were compared with the genotypes of mussels from the Baltic Sea, the North Sea and the Wadden Sea. Molecular genetic studies have shown that groups of mussels from six locations of the NWBS consist exclusively of individuals of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. The obtained data do not confirm the hypothesis of Sr. Rsch. Asst., Dr. Sci. (Biol.) N. M. Shurova (2009, 2013) about the presence of closely related mussel species *M. trossulus* and *M. edulis* and their hybrids with *M. galloprovincialis* in the investigated locations of the Black Sea. However, the presence of hybridization between the species *M. trossulus* and *M. edulis* in the Baltic Sea and the species *M. edulis* and *M. galloprovincialis* in the North and Wadden Seas was confirmed.

A comparative analysis of the nucleotide sequences of the «variable region» genes of the leg adhesive protein of mussels of the genus *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*) presented in the GenBank database was carried out,

which contributes to the understanding of the presence of polymorphisms in the studied part of the genome and argues for the possibility further application of the molecular marker *Me 15-16* for the differentiation of genotypes of four types of bivalve molluscs. Bioinformatics analysis of the nucleotide sequences of «variable region» of the adhesive protein genes proved the presence of mutations in the studied region, which make it possible to distinguish four representatives of the genus *Mytilus*. According to the performed phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the *Fp1* gene region, the species *M. galloprovincialis* is more related to the species *M. trossulus*, *M. edulis* and *M. chilensis* than to *M. californianus* and *M. coruscus*. Using bioinformatics methods, an analysis of the primary and secondary structure of the *M. galloprovincialis* adhesive protein was carried out and models of its three-dimensional structure were built.

In this study, for the first time, the genetic diversity and genetic structure of the population for a number of groups of mussels from the NWBS were analyzed using microsatellite analysis. To compare the allelic characteristics of the studied MS-loci (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) obtained for the Black Sea mussel *M. galloprovincialis*, other types of mussels from the Baltic, North and Wadden Seas were also analyzed. Significant differences in allele frequencies of MS-loci between the studied samples of mussels are shown. A deficiency of heterozygous genotypes among the studied molluscs of the NWBS and low levels of genetic differentiation between the studied mussel groups were established. A high genetic similarity of mussel groups from the Black Sea was revealed, compared to mussel groups of the Baltic, North and Wadden Seas.

The results of the tissue-specific profile of a set of enzymes providing antioxidant protection and biotransformation of xenobiotics in bivalve molluscs are presented in the thesis. In five mussel organs (hepatopancreas, ctenidia, mantle, leg, adductor muscle) from the Black Sea, protein polymorphism was studied, iso-allozyme tissue distribution of protective enzyme systems and coordinated activity of these systems in mussel target organs were shown. For the first time, the method of detecting isoforms of the antioxidant system enzymes – peroxiredoxins (PRX, EC 1.11.1.15), which play an important role in protecting the body against oxidative stress, was described on electrophorograms (Toptikov et al., 2022). The possibility of using enzymes as biochemical markers for

genetic differentiation of mussel groups was considered, and conclusions were drawn in favor of the use of DNA markers.

Keywords: bivalves, mussels, *Mytilus galloprovincialis*, polymorphism, diversity, genetic structure, molecular genetic analysis, iso-allozyme analysis, molecular markers, microsatellite loci (SSR), PCR, enzymes of the antioxidant system, biotransformation enzymes, bioinformatics methods.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>MYTILUS</i> (огляд літератури).....	21
1.1. Генетичний поліморфізм у популяціях двостулкових молюсків	21
1.2. Таксономічне положення і географічне поширення роду <i>Mytilus</i>	22
1.3. Використання різних типів ДНК-маркерів для встановлення таксономічного статусу представників роду <i>Mytilus</i>	26
1.4. Ензими як біохімічні маркери генетичної різноманітності та адаптивності мідій до умов довкілля	27
1.5. Особливості організації геному <i>Mytilus galloprovincialis</i>	29
1.6. Дифенціація поселень мідій Чорного моря за допомогою морфологічного аналізу	33
1.7. Актуальність генетичних досліджень в аквакультурі мідій.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	37
2.1. Матеріал для дослідження	37
2.2. Методи дослідження	40
2.2.1. Методи виділення геномної ДНК	40
2.2.1.1. Метод виділення ДНК за допомогою СТАВ-буфера.....	40
2.2.1.2. Метод виділення ДНК за допомогою SureFood® PREP Basic.....	41
2.2.1.3. Метод виділення ДНК за допомогою <i>Quick-DNA Miniprep Kit</i>	42
2.2.2. Молекулярно-генетичний аналіз мідій.....	43

2.2.2.1. ПЛР-аналіз із молекулярним маркером <i>Me 15-16</i>	43
2.2.2.2. Мікросателітний аналіз	44
2.2.2.3. Електрофорез продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі.....	46
2.2.2.4. Візуалізація продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі за допомогою фарбування з використанням $AgNO_3$	46
2.2.2.5. Документування та аналіз гель-електрофореграм ПЛР-продуктів.....	47
2.2.2.6. Статистична обробка результатів молекулярно-генетичного аналізу....	48
2.2.3. Біоінформатичний аналіз адгезивного білка мідій	49
2.2.4. Генетико-біохімічний аналіз мідій	50
2.2.4.1. Методи екстракції ензимів.....	50
2.2.4.2. Електрофоретичне фракціонування білків.....	50
2.2.4.3. Візуалізація білкових фракцій на електрофореграмах	53
2.2.4.3.1. Виявлення супероксиддисмутазної активності.....	53
2.2.4.3.2. Виявлення фероксидазної активності.....	53
2.2.4.3.3. Виявлення глутатіонпероксидазної активності	54
2.2.4.3.4. Виявлення пероксидазної активності	54
2.2.4.3.5. Виявлення активності пероксиредоксинів	54
2.2.4.3.6. Виявлення каталазної активності	55
2.2.4.3.7. Виявлення глутатіонредуктазної активності.....	55
2.2.4.3.8. Виявлення НАДН- та НАДФН-оксидазної активностей.....	56
2.2.4.3.9. Виявлення карбоангідразної активності.....	56
2.2.4.3.10. Виявлення амінооксидазної активності.....	56
2.2.4.3.11. Виявлення естеразної активності.....	57
2.2.4.3.12. Виявлення глутатіон-S трансферазної активності	57

2.2.4.4. Документування та аналіз гель-електрофореграм протеїнів.....	58
2.2.4.5. Статистична обробка результатів генетико-біохімічного аналізу	60
РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІДІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА <i>Me 15-16</i>.....	61
3.1. Визначення видової приналежності мідій північно-західного регіону Чорного моря за результатами молекулярно-генетичного аналізу	61
3.2. Визначення видової приналежності мідій Балтійського, Північного та Ватового морів за результатами молекулярно-генетичного аналізу.....	63
3.3. Генетична характеристика угруповань мідій за допомогою <i>Me 15-16</i>	66
РОЗДІЛ 4. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ АДГЕЗИВНОГО БІЛКА МІДІЙ РОДУ <i>MYTILUS</i>	69
4.1. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка представників роду <i>Mytilus</i>	69
4.2. Аналіз структури адгезивного білка <i>Mytilus galloprovincialis</i>	74
РОЗДІЛ 5. МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ТА СТРУКТУРИ ПОПУЛЯЦІЇ МІДІЙ	77
5.1. Алельна характеристика мідій за мікросателітними локусами	77
5.2. Генотипова характеристика мідій за мікросателітними локусами	94
РОЗДІЛ 6. ПОЛІМОРФІЗМ І РОЗПОДІЛ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА БІОТРАНСФОРМАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ У <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> З ПЗЧМ	98
6.1. Поліморфізм, тканинний розподіл та активність ензимів антиоксидантної системи у <i>Mytilus galloprovincialis</i>	98
6.2. Поліморфізм, тканинний розподіл та активність ензимів біотрансформації у <i>Mytilus galloprovincialis</i>	110

6.3. Кореляційні зв'язки між досліджуваними ензимами	114
6.4. Диференціація <i>M. galloprovincialis</i> за допомогою біохімічних маркерів...	120
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	123
ВИСНОВКИ	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128
ДОДАТОК А	156
ДОДАТОК В.....	159

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система

АФК – активні форми кисню

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ММФ – множинні молекулярні форми

МС-аналіз – мікросателітний аналіз

МС-локус – мікросателітний локус

МС-маркер – мікросателітний маркер

НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НТС – нітротетразолій синій

п.н. – пара нуклеотидів

ПААГ – поліакриламідна гелюва пластина

ПЗЧМ – північно-західна частина Чорного моря

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ТБЕ – трис-борат-ЕДТА буфер

ТБЦ – трис-борат-цитратний буфер

ТЕМЕД – N, N, N', N'-тетраметилетилендіамін

ФМС – феназинметасульфат

dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфати

DUI (Doubly uniparental inheritance) – подвійне однобатьківське успадкування

PAV (Presence-absence variation) – явище присутності-відсутності варіації генів

PCoA (Principal Coordinates Analysis) – метод аналізу головних координат

SSR (Simple sequence repeat) – прості послідовності, що повторюються

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) – незважений парногруповий метод з арифметичним усередненням

pUC 19 / Msp I – маркер молекулярної маси

СТАВ – цетилтриетиламмоній бромід

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Середземноморська мідія *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia, Mytilidae) відноситься до одного з найбільш розповсюджених видів двостулкових молюсків, що існує в екосистемі Чорного моря. За даними літератури (Zolotarev, 1996; Alexandrov et al., 2007; Zhulidov et al., 2021; Manilo et al., 2022) відомо, що відбувається ненавмисна інтродукція в Чорне море гідробіонтів з інших районів Світового океану. Українські вчені (Александров та ін., 2020) пояснюють потрапляння чужоземних видів у Чорне море, їхньою природною міграцією із Середземного моря через протоку Босфор та випадковою інтродукцією шляхом перевезення з баластними водами суден. У зв'язку з цим, збільшується ймовірність появи в Чорному морі інших близьких видів мідій – *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) і *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). Про можливість такого припущення свідчить виявлення за допомогою генетичного аналізу з використанням молекулярного маркера *Me 15-16* серед мідій Адріатичного моря ($n = 110$), які відносилися за морфологічними характеристиками виключно до виду *M. galloprovincialis*, двох гібридів – *M. galloprovincialis* × *M. edulis* і *M. galloprovincialis* × *M. trossulus* (Hamer et al., 2013).

Станом на даний момент, генетичних підтверджень присутності в Чорному морі інтродукованих видів *M. trossulus*, *M. edulis* і їх гібридів з нативним видом *M. galloprovincialis* немає. За результатами багатовимірної морфометричного аналізу (Шурова, 2013), серед особин мідій *M. galloprovincialis* в ПЗЧМ зустрічаються молюски, які за морфологічними особливостями мушлі не відрізняються від *M. edulis* і *M. trossulus* інших регіонів. Без встановлення видової приналежності мідій ПЗЧМ, за допомогою молекулярно-генетичного аналізу, цих молюсків розглядають як *galloprovincialis*-, *trossulus*- та *edulis*-подібні морфи (Шурова, 2009, 2013). Найбільшу кількість *trossulus*-подібних морф було відзначено в прибережних опріснених водах та в районах з високим рівнем антропогенного навантаження. У ПЗЧМ *trossulus*-подібні молюски мають меншу швидкість росту і тривалість життя, ніж *galloprovincialis*-подібні, що

відображається на біомасі їх поселень (Стадниченко и др., 2013). Відомо (Стадниченко, 2019), що в акваторії Одеського регіону близько 60% молюсків у поселеннях представлені *galloprovincialis*-подібними мідіями, а *trossulus*-подібних зустрічається менше 30%. Тому слід припустити, що ймовірно поява *trossulus*- і *edulis*-подібних особин мідій може бути результатом гібридизації видів *M. edulis* і *M. trossulus* з видом *M. galloprovincialis*. Але з генетичної точки зору це питання залишається недоведеним.

На сьогоднішній день виникає необхідність у правильному розпізнаванні та ідентифікації видів для розуміння філогеографії живих ресурсів, забезпечення збереження їхнього біорізноманіття, а також для стійкої експлуатації та розведення в аквакультури. Для вирішення цих питань широко використовуються ДНК-маркери. Поряд з аналізом нуклеїнових кислот, ще одним важливим способом отримання інформації про генотип є дослідження поліморфізму білків за допомогою біохімічних маркерів (ензимів). Білковий поліморфізм серед молюсків фауни Чорного моря широко вивчений у черевоногого молюска – *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) з використанням загальноклітинних ензимів та ензимів, відповідальних за захисні та сигнальні реакції в організмі (Єршова та ін., 2014; Тортіков et al., 2016, 2019, 2022). За результатами алозимного аналізу було з'ясовано, що різні поселення рапани у Чорному морі мають високий рівень гетерозиготності, формують одну популяцію, а їх окремі угруповання обмінюються між собою генетичним матеріалом. На основі аналізу генетичної структури досліджуваних вибірок рапани В. А. Топтіковим зі співавторами (2019) було висунуто гіпотезу про важливу роль міграційних процесів у формуванні значної гетерозиготності рапани, що забезпечує високу здатність пристосовуватися до екстремальних умов середовища.

З'ясування сучасного стану популяції мідій Чорного моря потребує встановлення генетичної ідентичності виду та вивчення генетичної структури окремих угруповань і популяції, і в першу чергу такого важливого показника в популяційній генетиці, як рівень генетичного поліморфізму.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у період 2019-2023 рр. на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики (до реорганізації кафедра генетики та молекулярної біології) біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова в рамках проекту «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичного поліморфізму живих систем» (2021-2025 рр.) з державним реєстраційним номером 0121U109169 при Українському інституті науково-технічної експертизи та інформації.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було визначення генетико-біохімічних характеристик *Mytilus galloprovincialis* і генетичного поліморфізму угруповань мідій в північно-західній частині Чорного моря за допомогою молекулярних ДНК-маркерів та ізо-алозимного аналізу.

Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

1. Встановити видову приналежність мідій ПЗЧМ за допомогою молекулярного маркера *Me 15-16*, розробленого до неповторювальної області гена *Fp1* адгезивного білка *Mefp-1* мідії.
2. З'ясувати, чи зустрічаються види *M. edulis* та *M. trossulus* та їх гібриди з *M. galloprovincialis* у ПЗЧМ.
3. Провести біоінформатичний аналіз генів адгезивного білка мідій роду *Mytilus*.
4. Визначити поліморфізм угруповань мідій ПЗЧМ за допомогою мікросателітних маркерів.
5. Визначити поліморфізм за допомогою біохімічних маркерів в угрупованнях мідій ПЗЧМ.
6. Розглянути можливість використання ензимів, як біохімічних маркерів, для генетичної диференціації угруповань мідій ПЗЧМ.

Об'єкт дослідження: генетична різноманітність угруповань мідії.

Предмет дослідження: генетичний поліморфізм за геном *Fp1* і мікросателітними локусами, структура популяції та біохімічні характеристики мідії ПЗЧМ.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (екстракція геномної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), мікросателітний аналіз, електрофорез продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі (ПААГ), візуалізація продуктів ампліфікації за допомогою AgNO_3), біохімічні методи (екстракція білків, електрофоретичне розділення білків у ПААГ, візуалізація та визначення активності білкових фракцій в гелі після електрофоретичного фракціонування), статистичні й біоінформатичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі молекулярно-генетичних даних виконаного експериментального дослідження доведено присутність мідій виду *M. galloprovincialis* в ПЗЧМ і відсутність видів *M. edulis*, *M. trossulus* та їх гібридів з *M. galloprovincialis*. Досліджено алельне і генотипове різноманіття, визначено частоту алелів та оцінено показники генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами на вибірках мідій ПЗЧМ та зразках мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів. За результатами мікросателітного аналізу було з'ясовано, що досліджувані угруповання молюсків ПЗЧМ мають високий рівень генетичної різноманітності та формують одну популяцію чорноморської мідії *M. galloprovincialis*.

Визначено поліморфізм, тканинний розподіл та активність 13 ензимів, що забезпечують антиоксидантний захист та біотрансформацію ксенобіотиків у п'яти органах чорноморської мідії (гепатопанкреас, ктенідія, мантия, нога, мускул-аддуктор). Встановлено, що всі досліджувані ензими є поліморфними, кожний орган відрізнявся рівнем активності ензимів та набором молекулярних форм. Однак, ці ензими виявилися неефективними для диференціації угруповань мідій з різних локацій Чорного моря.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи впроваджено у навчальну програму підготовки докторів філософії за спеціальністю 091 «Біологія», а саме в лекційний курс «Молекулярні маркери». Акт впровадження додається (додаток В). Отримані результати спектрів біохімічних маркерів рекомендовано залучати для вивчення різних представників роду *Mytilus*.

Одержані експериментальні дані МС-аналізу можуть бути використані для ДНК-генотипування молюсків з метою створення певних відселектованих вибірок мідій *M. galloprovincialis*, що будуть мати покращені споживчі характеристики і високий адаптивний потенціал для розведення і вирощування в аквакультури Чорного моря. Представлені в роботі дані свідчать на користь існування однієї популяції мідій *M. galloprovincialis* в ПЗЧМ, що важливо враховувати при промисловому вилові мідій.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом разом з науковим керівником доктором біологічних наук, професором Чеботар С. В. складено план досліджень, сформульовано основні положення та висновки дисертаційної роботи. Здобувачем спільно з кандидатом біологічних наук, доцентом Топтїковим В. А. виконано експериментальну частину роботи з генетико-біохімічного аналізу. Автором особисто проведено інформаційний пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертації, виконано експериментальну частину роботи з молекулярно-генетичного аналізу, здійснено статистичну обробку отриманих результатів та написання дисертаційної роботи.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на II науково-практичній конференції «Інноватика в сучасній освіті та науці: теорія і практика» (Ужгород, Україна, 2020), на I Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2021), на Міжнародній науково-практичній конференції «Challenges, threats and developments in biology, agriculture, ecology, geography, geology and chemistry» (Lublin, Polish, 2021), на Міжнародній науковій конференції «Marine ecosystems: research and innovations» (Odesa, Ukraine, 2021), на XXI Міжнародній Гамовській конференції на Біологічній секції «The Importance of G. Gamow's Ideas for Biology of the 21st Century» (Odesa, Ukraine, 2021), на All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology (Kyiv, Ukraine, 2022), на IV International Agricultural, Biological & Life Science Conference (Edirne, Turkey, 2022), на The National Conference with international participation «Natural sciences in the dialogue of generations» (Chisinau,

Republic of Moldova, 2023). Результати експериментальних досліджень були представлені на наукових семінарах кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики та щорічних звітних конференціях біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 наукових праць, вісім із яких є тезами міжнародних та вітчизняних конференцій та чотири статті, три з яких у журналах категорії А, що входять в наукометричну базу Scopus і одну у науковому фаховому журналі, що відноситься до категорії Б.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 159 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 30 рисунками та 15 таблицями. Список використаних джерел складає 257 найменувань.

Автор висловлює щире подяку науковому керівникові член-кореспонденту НААН України, професору, доктору біологічних наук Чеботар Сабіні Віталіївні за керівництво роботою, допомогу в плануванні експериментів та в інтерпретації результатів, за допомогу в підготовці публікацій та рукопису дисертації. Здобувач висловлює подяку кандидату біологічних наук, доценту кафедри генетики та молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова Топтікову Валентину Анатолійовичу за допомогу в проведенні генетико-біохімічних досліджень. Також автор дякує співробітникам ОНУ імені І. І. Мечникова: кандидату біологічних наук, доценту Чеботар Галині Олександрівні, завідувачу Гідробіологічної станції кандидату біологічних наук, доценту Ковтуну Олегу Олексійовичу, кандидату біологічних наук, провідному науковому співробітнику Снігірьову Сергію Михайловичу; старшому науковому співробітнику ДУ «Інститут морської біології НАН України» доктору біологічних наук Квачу Юрію Валерійовичу; співробітнику Ростоцького університету в Німеччині доктору природничих наук Андреасу Біку за збір матеріалу для проведення досліджень.

РОЗДІЛ 1. ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *MYTILUS* (огляд літератури)

1.1. Генетичний поліморфізм у популяціях двостулкових молюсків

Тип Mollusca є однією з найбільших і найрізноманітніших груп тваринного світу. Оцінки видового різноманіття описаних видів молюсків різняться між авторами: 34 000 (Boss, 1971), 70 000-76 000 (Rosenberg, 2014), 85 000 (Chapman, 2009), 120 000 (Ponder et al. 2002). Двостулкові молюски (*Bivalvia*) – другий за величиною таксономічний клас у типі Mollusca, який включає близько 9 200 морських і прісноводних видів. Морські двостулкові молюски представляють близько 8 000 видів, які об'єднані в чотири підкласи і 99 родин з 1 100 родами (Huber, 2010).

Генетичний поліморфізм забезпечує різноманіття, завдяки якому може діяти природний відбір. Зміна середовища постійно змінює відповідність даних генотипів. Зазвичай, морфологію двостулкових молюсків, зокрема форму раковини, розглядають як кульмінацію серії еволюційних подій, які привели форму двостулкових молюсків у рівновагу з вимогами навколишнього середовища. Подібним чином моделі різноманітності та появи видів вважаються індикаторами екологічних та еволюційних процесів, що регулюють видоутворення та вимирання. Фактори, які керують такими еволюційними змінами, можна з'ясувати лише за умови глибокого знання екологічного та генетичного контексту, у якому відбуваються зазначені еволюційні події (Levinton, Lassen, 1978).

Велика кількість генетичних досліджень із залученням молюсків виявили низку характеристик, які дозволяються диференціювати їх між собою. Зокрема, було показано, що молюски *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012), *Ostrea edulis* (Harrang et al., 2013), *Mytilus chilensis* (Penaloza et al., 2014), *Patinopecten yessoensis* (Wang et al., 2017), *Mytilus galloprovincialis* (Gerdol et al., 2020), *Anodonta anatine* (Lyubas et al., 2023) демонструють надзвичайно високий рівень ядерного генетичного різноманіття порівняно з багатьма іншими таксонами. В дослідженнях

природних і культивованих популяціях двостулкових молюсків за результатами генетичного аналізу з використанням різних типів маркерів, включаючи алозими (Zouros, Foltz, 1984; Mallet et al., 1985; Toro, Vergara, 1995; Myrand et al., 2002), мікросателіти (Bierne et al., 1998; Launey, Hedgecock, 2001; Wei et al., 2013; Daniels, Litvaitis, 2017; Hamilton et al., 2023), SNP (Hedgecock et al., 2015; Penaloza et al., 2014; Niu et al., 2017) найчастіше спостерігався дефіцит гетерозиготних генотипів та неменделівська сегрегація у парних схрещуваннях. Основними причинами цих явищ можуть бути: наявність нуль алелів, анеуплоїдія, інбридинг, ефект Валунда або певна форма відбіру (Beaumont, 1991).

Нейтральна теорія еволюції передбачає, що стабільний рівень гетерозиготності має позитивно змінюватись із розміром популяції і частотою мутацій (Nei, Li, 1979). Ймовірно, що обидва фактори сприяють екстремальним рівням варіацій, що спостерігаються у двостулкових молюсків. Висока плодючість молюсків і схильність до нересту сприятимуть збільшенню розміру популяції (Hedgecock, Pudovkin, 2011). Крім того, частота мутацій для молюсків може бути підвищеною через кількість премейотичних поділів, при формуванні пулу клітин-попередників, на початкових етапах гаметогенезу, необхідних для виробництва мільйонів яєць під час розмноження (Plough et al., 2016). Спостереження за численними мобільними елементами в геномах молюсків та високою частотою структурних варіацій, також підтверджують гіпотезу про підвищену частоту мутацій у двостулкових молюсків (Plough, 2016; Murgarella et al., 2016; Gerdol et al., 2020).

1.2. Таксономічне положення і географічне поширення роду *Mytilus*

Мідії роду *Mytilus* є бентосними організмами, що мешкають у помірних і холодних водах обох півкуль (Hilbish et al., 2000; Gerard et al., 2008; Gosling, 2015). В останні десятиліття відбулося значне зростання інтересу науковців до вивчення таксономічного статусу популяцій *Mytilus*, здебільшого завдяки появі уточнених даних молекулярно-генетичного аналізу (Toro et al., 2005; Gerard et al., 2008;

Westfall, Gardner, 2010; Larraín et al., 2019), хоча деякі розбіжності в інформації щодо чисельності та ідентичності видів, які мешкають у Південній Америці, залишаються (Oyarzún et al., 2014).

Відповідно до Світового реєстру морських видів (WoRMS) (<https://www.marinespecies.org>), на сьогоднішній день до роду *Mytilus* відносять 8 видів мідій: *Mytilus californianus* Conrad, 1837, *Mytilus chilensis* Hupé, 1854, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, *Mytilus planulatus* Lamarck, 1819, *Mytilus platensis* d'Orbigny, 1842, *Mytilus trossulus* Gould, 1850 та *Mytilus unguiculatus* Valenciennes, 1858 (або *Mytilus coruscus* Gould, 1861).

Приблизний географічний розподіл видів мідій роду *Mytilus* було зроблено Gaitán-Espitia et al. (2016) (рис. 1.1).

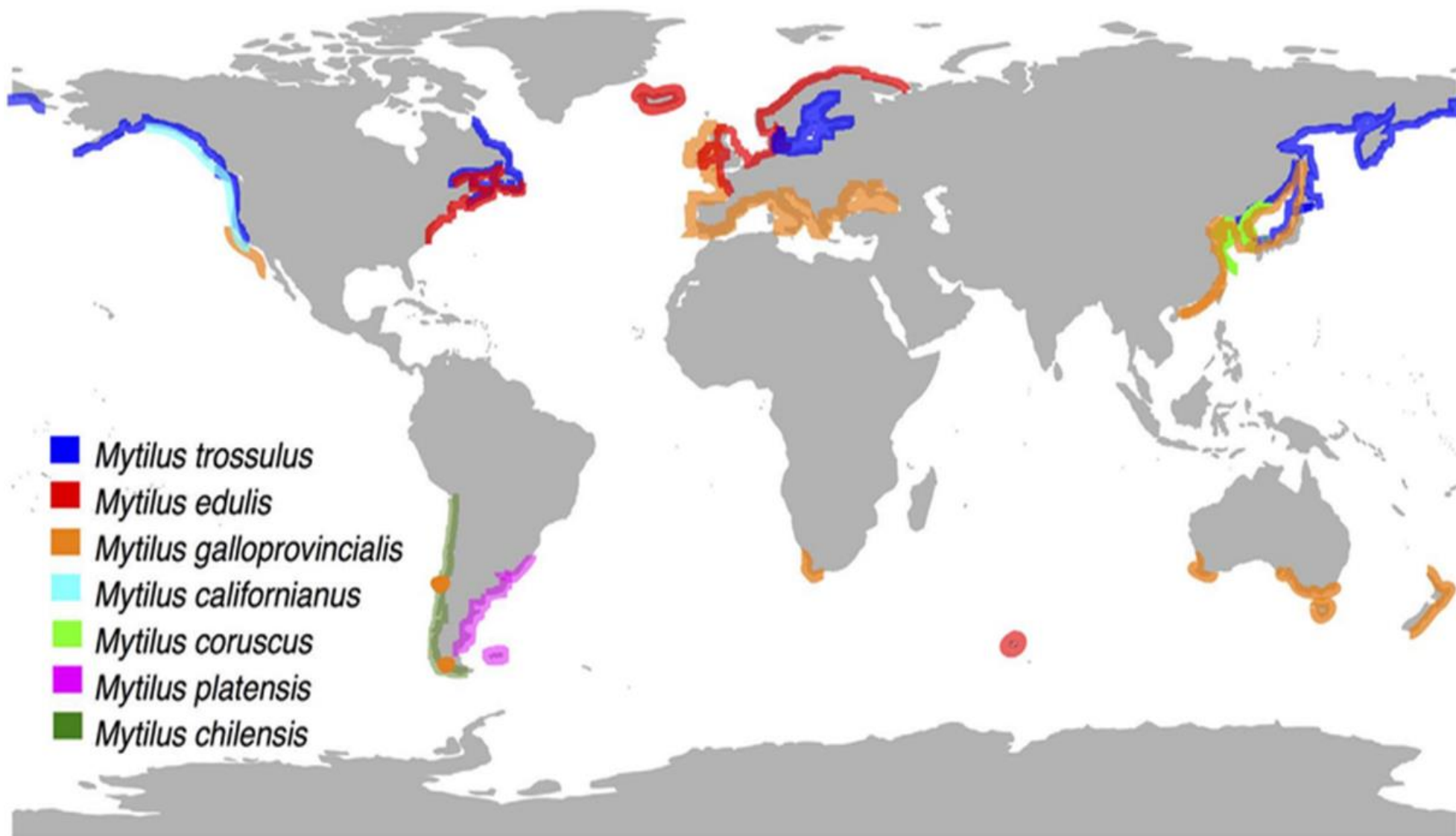


Рис. 1.1. Географічне поширення мідій роду *Mytilus* (за даними Gaitán-Espitia et al., 2016).

Досліджувана група молюсків демонструє типове антитропічне поширення з п'ятьма видами, що зустрічаються в Північній півкулі (*M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californianus* і *M. coruscus*) і трьома видами в Південній півкулі (*M. chilensis*, *M. galloprovincialis* і *M. platensis*).

Вид *M. galloprovincialis*, який походить із Середземного моря і пізніше поширився вздовж узбережжя Атлантичного океану аж до Британських островів, також вторгся в узбережжя Південної півкулі (Lourenco et al., 2015). Зокрема, було підтверджено наявність двох видів мідій в південно-західній частині Тихого океану: *Mytilus aoteanus* Powell, 1958 (наразі це синонім *M. galloprovincialis* – WoRMS) в Новій Зеландії та *Mytilus planulatus* Lamarck, 1819 в Австралії (Oyarzún et al., 2021).

Близькоспоріднені блакитні мідії з «видового комплексу *Mytilus*» (*M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*), а також їх південний аналог *M. chilensis*, здатні схрещуватися між собою, коли співіснують просторово, утворюючи гібридні зони. Це включає регіони, розташовані на південному заході Великобританії (Hilbish et al., 2002; Vendrami et al., 2020), європейське узбережжя північно-східної Атлантики (Bierne et al., 2003; Fraïsse et al., 2016; Simon et al., 2021), північно-західна Атлантика (Rawson et al., 2001; Toro et al., 2004), Балтійське море (Riginos, Cunningham, 2005; Stuckas et al., 2017), субарктичні та арктичні регіони (Mathiesen et al., 2017), північно-східна частина Тихого океану (Rawson et al., 1999; Saarman, Pogson, 2015), південній і східній частині Тихого океану (Larraín et al., 2019; Popovic et al., 2020).

Присутність видів блакитних мідій «видового комплексу *Mytilus*» в Північній півкулі повідомляється в Чилі, де були виявлені гібриди *M. chilensis* × *M. galloprovincialis*, *M. chilensis* × *M. trossulus* і *M. chilensis* × *M. edulis* (Jilberto et al., 2017; Larraín et al., 2012, 2018).

1.3. Використання різних типів ДНК-маркерів для встановлення таксономічного статусу представників роду *Mytilus*

Розробка сучасних популяційних та молекулярно-генетичних методів, особливо використання ДНК-маркерів, сприяло значному спрощенню таксономічного аналізу. На даний момент, ідентифікацію представників роду *Mytilus* проводять за допомогою генетичних маркерів із методичними підходами, що спираються на секвенування мітохондріальних генів (Astorga et al., 2015; Abbadí et al., 2017; Pickett, David, 2018) та використання ДНК-маркерів на основі ПЛР. До таких ДНК-маркерів відносять: AFLP – поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів (Groenenberg et al., 2011), RAPD – випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (Rego et al., 2002), FINS – криміналістично інформативне секвенування нуклеотидів (Santacilara et al., 2006) і FLP – поліморфізм довжини фрагмента. Щоб підвищити специфічність FLP-аналізу, додають етап ферментативної рестрикції для отримання маркерів поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP) (Heath et al., 1995; Rawson et al., 1996).

Для дослідження мітохондріальних ДНК (мтДНК) локусів мідій використовують метод PCR-RFLP. RFLP-аналіз спрямований на такі гени, як велика субодиниця *16S* гена рРНК (Westfall et al., 2010) та область субодиниці I гена цитохромоксидази C (*COI*) (Fernández-Tajes et al., 2011). FLP-аналіз націлений щонайменше на сім ядерних локусів *Mytilus*: *ITS* – внутрішньотранскрибовані спейсерні ділянки між областями ядерного кодування *18S* і *28S* рДНК (Heath et al., 1995); *PLIIa* – протаміноподібний упаковковий білок сперми (Heath et al., 1995); *mac-1* – поліморфізм довжини інтрона в локусі гена актину (Ohresser et al., 1997); *EFbis* – поліморфізм довжини у факторі елонгації 1 кДНК (Bierne et al., 2002); *MAL-I* (*Mytilus* anonymous locus-I) (Rawson et al., 2001); акросомальний білок сперми M7 лізин (Kijewski et al., 2009) і ген адгезивного білка (Inoue et al., 1995).

Переважаю, для ідентифікації видів *Mytilus* широко використовується саме ген адгезивного білка ноги мідії, до якого було розроблено велику кількість

маркерних систем. Inoue et al. (1995) розробили набір праймерів (*Me 15 / Me 16*) для генетичної ідентифікації трьох видів мідій (*M. edulis*, *M. trossulus* і *M. galloprovincialis*), а Santaclara et al. (2006) з використанням молекулярного маркера *Me 15-16* та рестрикційного фермента *Aci I* змогли відрізнити вид *M. chilensis* від *M. galloprovincialis* Північної півкулі. Rawson et al. (1996) розробили молекулярні маркери для *Glu* гена: *Glu-5'*, який дозволяє ідентифікувати три види мідій Північної півкулі: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* і *M. trossulus*, та *Glu-3'*, який відрізняє *M. edulis* від *M. galloprovincialis*. Fernández-Tajes et al. (2011) використовували праймери *Myti-F/R* та подальше розщеплення рестрикційними ферментами (*Aci I* та *Acl I*) для диференціації комерційних видів *Mytilus*, тоді як Jilberto et al. (2017) використовували пару праймерів PАРМ F/R з подальшим аналізом плавлення з високою роздільною здатністю (High resolution melting analysis) для диференціації *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* та їх гібридів. Відзначається (Larraín et al., 2019), що розроблені молекулярні маркери: *Me 15-16*, *Glu-5'*, *Myti* та PАРМ – націлені на одну і ту ж область в гені адгезивного білка ноги мідії.

Сьогодні також можливо провести надійну ідентифікацію, як диких, так і вирощених на фермах популяцій мідій за допомогою високоінформативних SNP-масивів даних про генотип (Wilson et al., 2018; Chen et al., 2020; Simon et al., 2021; Nascimento-Schulze et al., 2023).

1.4. Ензими як біохімічні маркери генетичної різноманітності та адаптивності мідій до умов довкілля

Ферменти як біохімічні маркери широко використовуються для оцінки генетичної варіації в популяції. Слід відмітити, що відповідно до сучасної термінології доцільно використовувати терміни «ензим», а не «фермент» (Barrett, 1997). Зараз біохімічні маркери витіснені більш інформативними – ДНК-маркерами. Проте, як і раніше залишаються одними з найшвидших та найдешевших систем маркерів, що розробляються, і залишаються дієвим

інструментом для проектів, які потребують лише виявлення низьких рівнів генетичних варіацій.

Для ензимів характерним є утворення множинних молекулярних форм (ММФ): ізоферментів («ізоензим» або «ізозим») та алозимів («алелозим»). Термін «ізоферменти» був введений для позначення різних молекулярних форм одного і того ж ферменту, що зустрічається або в одній особині, або в різних представниках одного виду (Markert, Moller, 1959). Численні дослідження різних ензимів показали (Kenney, 1974; Moss, 1982; Buth, 1990), що існують три основні причини утворення ММФ. По-перше, наявність більше ніж одного локусу гена, що кодує ензим. По-друге, наявність більше ніж одного алеля в одному локусі гена, що кодує ензим. По-третє, посттрансляційні модифікації утворених ферментативних поліпептидів, що призводять до утворення негенетичних або так званих «вторинних» ізоферментів.

Термін «ізоферменти» зазвичай використовується для позначення численних молекулярних форм, які кодуються різними генами, присутніми в різних локусах, Термін «алозими» використовується для позначення кількох молекулярних форм, які кодуються різними алелями, присутніми в одному локусі. Для того, щоб встановити генетичну природу різних молекулярних форм, які виявляються після електрофоретичного розділення, слід проводити спеціальний генетичний аналіз (Топтіков та ін., 2017).

Ізоферменти та алозими широко використовуються для вирішення багатьох проблем систематики, а також для реконструкції філогенетичних зв'язків між спорідненими видами. Вони мають важливе значення для генетичного моніторингу забруднення навколишнього середовища та оцінки генетичних ресурсів (Manchenko, 2003).

Генетико-біохімічний аналіз надав перші уявлення про різноманітність та зоогеографію роду *Mytilus*. Біло встановлено, що *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus* та їх гібридні форми розрізняються за частотами ряду алозимних локусів: аміотрипептидаза (*AP*, КФ 3.4.1.3), естераза (*EST*, КФ 3.1.1.1), октопіндегідрогеназа (*ODH*, КФ 1.5.1.11), глюкозофосфатізомераза (*GPI*, КФ

5.3.1.9), фосфогліцератмутуза (*PGM*, КФ 5.4.2.12), манозофосфатізомераза (*MPI*, К.Ф.5.3.1.8), аланінамінопептидаза (*AAP*, КФ 3.4.11.2), лейцинамінопептидаза (*LAP*, КФ 3.4.11.1) (Skibinski et al., 1983; McDonald, Koehn, 1988; Bulnheim, Gosling, 1988; Varvio et al., 1988; Väinölä, Hvilsom, 1991; McDonald et al., 1991; Väinölä, Strelkov, 2011). Отрамані дані за допомогою алозимного аналізу сприяли подальшому дослідженню *Mytilus* з використанням ДНК-маркерів.

1.5. Особливості організації геному *Mytilus galloprovincialis*

Відомо (Thiriot-Quiévreux, 1994), що види *Mytilus* мають $2n = 28$ хромосом і морфологічно консервативні каріотиби. У родині Mytilidae молекулярна організація генів гістонів була охарактеризована для *M. edulis* (Drabent et al., 1999; Albig et al., 2003) і *M. galloprovincialis* (Eirín-López et al., 2002; Eirín-López et al., 2004). Як і в інших видів безхребетних, гени гістонів розташовані в кластерах, що повторюються в тандемі. У *M. galloprovincialis* тандем генів складається як з корових, так і з лінкерних генів гістонів (*h4*, *h2b*, *h2a*, *h3*, *h1*) і двох повторів 5S рДНК (Eirín-López et al., 2004). Лінкерні гени гістонів утворюють незалежні кластери (Eirín-López et al., 2002). Каріотиби *M. galloprovincialis* і *M. edulis* демонструють високу подібність, а хромосомний розподіл генів гістонів та кластерів рДНК не демонструє жодних відмінностей (Pérez-García et al., 2014).

Слід зазначити, що у мідій роду *Mytilus* було виявлено подвійне однобатьківське успадкування (Doubly uniparental inheritance, DUI) передачі мітохондріальної ДНК (мтДНК) нащадкам. У більшості видів тварин мтДНК передається по материнській лінії, а батьківська мтДНК зникає на ранньому етапі розвитку ембріона (Avisé, 1991; Birky, 1995). На відміну від цього, інша схема передачі мтДНК, яка називається подвійним однобатьківським успадкуванням, була описана у 36 видів із семи різних родин двостулкових молюсків: Unionidae, Nuriidae, Margaritiferidae, Solenidae, Veneridae, Donacidae та Mytilidae (Theologidis et al., 2008). У цих видів молюсків існує два сильно розбіжних мітохондріальних геноми: один геном існує в усіх особин (самки або тип F), а інший геном – лише у

самців (тип М). Дослідження Zouros et al. (1994) показали, що при DUI у роді *Mytilus* самки успадковують мтДНК тільки від матері, але вони передають її як своїм донькам, так і своїм синам, а самці – успадковують мтДНК від обох батьків, але передають батьківську мтДНК лише синам. У дорослих особин мтДНК типу М домінує в чоловічих статевих залозах, а мтДНК типу F домінує в жіночих статевих залозах і в соматичних тканинах як самців, так і самок мідій (Garrido-Ramos et al., 1998). Таким чином, мтДНК типу М зберігається до і після запліднення, що є важливим елементом DUI. У середземноморської мідії *Mytilus galloprovincialis*, обидва мітохондріальні геноми були повністю секвеновані, середня розбіжність у нуклеотидній послідовності між батьківською та материнською лінією становить 20% (Mizi et al., 2005).

Завдяки науковому та комерційному інтересу до мідій, як до об'єкту аквакультури, було секвеновано геноми та проведено анотацію генів для п'яти видів *Mytilus*. Першим був секвенований геном *M. galloprovincialis* (Murgarella et al., 2016), а потім сиквенс був вдосконалений (Gerdol et al., 2020), і нещодавно було повідомлено про сиквенс геномів *M. coruscus* (Li et al., 2020; Yang et al., 2021), *M. edulis* (Corrochano-Fraile et al., 2022), *M. chilensi* (Gallardo-Escárate et al., 2023), *M. californianus* (Paggeot et al., 2022).

Порівняно з іншими двостулковими молюсками (Zhang et al., 2012; Wang et al., 2017; Uliano-Silva et al., 2018; McCartney et al., 2022), зареєстровані геноми мідій мають відносно великий і складний геном, що характеризується високою гетерозиготністю та численними мобільними елементами. Зокрема, отримані результати секвенування повідомляють про цікаві особливості геному мідій, такі як висока частка присутності-відсутності генів (Gerdol et al., 2020) або докази дублювання генома (Corrochano-Fraile et al., 2022).

За результатами Gerdol et al. (2020), розмір еталонного геному *M. galloprovincialis* – 1,28 млрд п.н. Він виявився дещо меншого розміру порівняно з цитогенетичними оцінками (Ieyama et al., 1994), й вищої якості порівняно з попередніми спробами секвенування (Murgarella et al., 2016). Геном

M. galloprovincialis має деякі типові риси інших двостулкових молюсків: низький вміст GC пар (32%) і значну присутність повторів (43%).

У геномі *M. galloprovincialis* виявлено складну пангеномну архітектуру з універсальним (core) набором із 45 000 генів і великою кількістю унікальних (dispensable) генів – 20 000, які залежать від феномену PAV (Presence-absence variation – варіації присутності-відсутності генів) та можуть бути повністю відсутні в деяких особин мідій.

Феномен PAV тісно пов'язаний із пангеномною концепцією, яка описує пангеном як «геном, що включає набір універсальних (основних) генів, які є в усіх індивідів, і унікальні (необов'язкові) гени, які повністю відсутні в деяких індивідуумів у популяції» (Medini et al., 2005). Основою пангеному є зміни вмісту генів у різних особин або популяцій, що належать до одного виду. Пангеноми були широко вивчені у прокаріотів (McInerney et al., 2017) і вірусів (Brito et al., 2015) та описані в рослинах (Golicz et al., 2016), мікроводоростей (Read et al., 2013) і грибах (McCarthy et al., 2019). До недавнього часу у тваринному світі повідомлялося лише про близькі пангеноми з низьким співвідношенням генів PAV. Це було у випадку людей (Sherman et al., 2019) та свиней (Tian et al., 2020), де геномна структурна варіація здебільшого пов'язана із міжгенними регіонами і варіаціями на рівні 1-10%. Подібні варіації були зареєстровані в інших хордових, таких як атлантична тріска *Gadus morhua* (Berg et al., 2016), японський вугор *Anguilla japonica* (Huang et al., 2021) та сільська ластівка *Hirundo rustica* (Secomandi et al., 2023).

За даними літератури (Gerdol et al., 2020; Calcino et al., 2021), у геномах диплоїдних організмів, таких як мідії, PAV виникає між гомологічними хромосомами особин, що призводить до великих гемізіготних геномних ділянок, які присутні лише в одній із двох гомологічних хромосом. Оскільки такі ділянки та гени, які вони містять, піддаються менделівському успадкуванню, на популяційному рівні кожна особина може мати одну (гемізіготна), дві (гомозиготна) або нуль копій (нуль алель) кожного унікального блоку ДНК (і пов'язаних генів), залежно від комбінації між батьківськими гаплотипами (рис. 1.2).

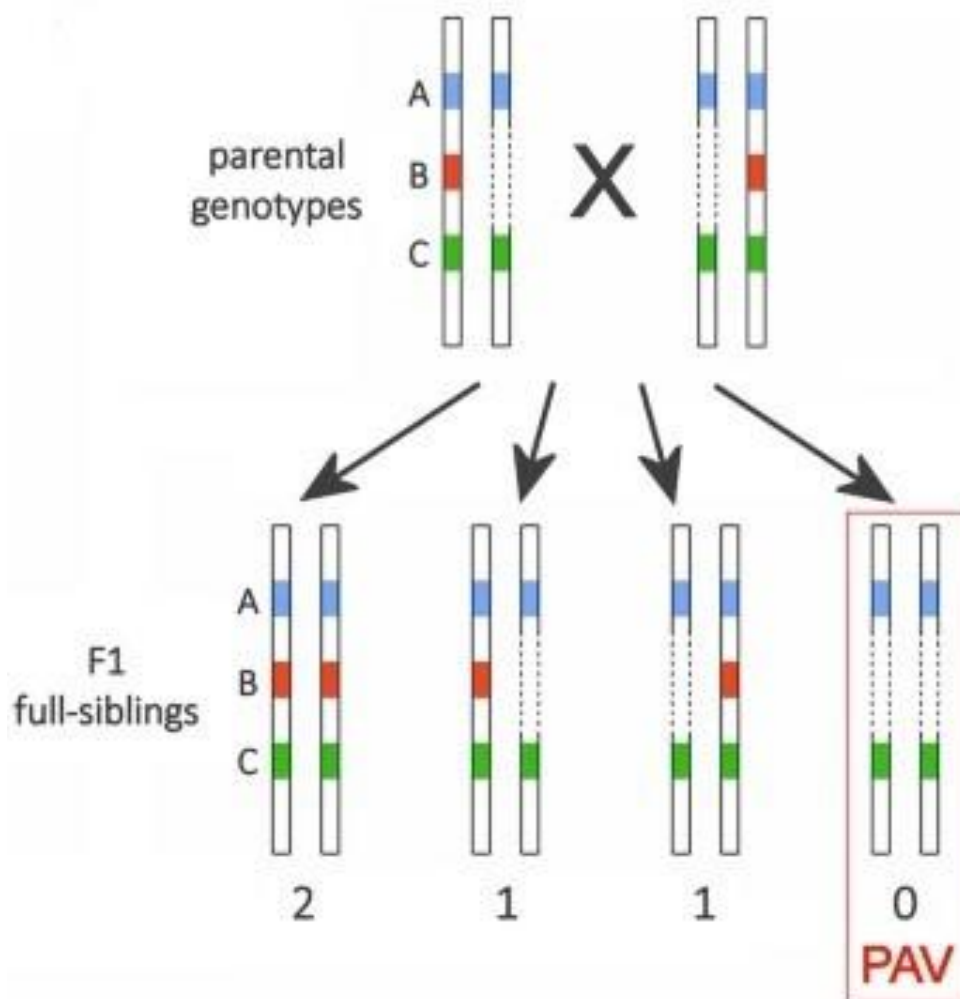


Рис. 1.2. Схематичне зображення можливого походження явища варіації присутності-відсутності генів у *M. galloprovincialis* (згідно Gerdol et al., 2020).

На рис. 1.2 зображено схрещування двох батьків, які несуть два універсальні гени (A і C) і один унікальний ген (B). У цьому випадку обоє батьків несуть одну копію унікального гена (тобто цей ген присутній у гемізіготній геномній ділянці). Слід зазначити, що гемізігота – це диплоїдна клітина (особина), яка має лише один алель певного гена, тобто генотип гемізіготного організму виражається не двома, а одним алелем, і цей алель завжди фенотипово проявляється, навіть тоді, коли він рецесивний (Даниленко та ін., 2017). Зазвичай гемізіготний стан характерний для генів у статевих хромосомах гетерогаметної статі. Виходячи з менделівської спадковості, явище PAV має спостерігатися у 25% нащадків отриманих від цього схрещування.

Було висунуте припущення (Gerdol et al., 2020), що унікальні гени пов'язані з гемізиготними геномними ділянками, ураженими структурними варіантами, на які в цілому припадає майже 580 млн п.н. послідовності ДНК, не включеної в збірку еталонного геному.

Дослідження Gerdol et al. (2020) – це перше повідомлення про відкритий пангеном тваринного світу з широко поширеним феноменом PAV, що вражає 38% усіх анотованих генів, який був зареєстрований в мідії *M. galloprovincialis* шляхом порівняльного геномного аналізу. Незвичайна структура геному *M. galloprovincialis* є результатом значної присутності гемізиготних геномних ділянок, які містять кілька тисяч незамінних генів, що кодують білки. Збагачення цих генів функціями, пов'язаними зі стійкістю до стресу та імунною відповіддю, вимагає подальшого дослідження можливих зв'язків між масивним PAV та еволюційним успіхом мідій, прикладом якого є космополітичне поширення *M. galloprovincialis* в помірних морських прибережних водах.

1.6. Дифенціація поселень мідій Чорного моря за допомогою морфологічного аналізу

Зазвичай, за морфологічними ознаками та з використанням багатовимірної морфометрії мідій Чорного моря відносять до виду *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Шурова, 2013). Чорноморські мідії широко поширені на шельфі та в обростаннях різних гідротехнічних споруд. В екосистемі Чорного моря мідії утворюють самостійний біоценоз і входять до складу інших зооценозів. Основні скупчення молюсків зосереджені в порівняно мілководній опрісненій ПЗЧМ.

Мідій з «видового комплексу *Mytilus*» (*M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*), зважаючи на значну мінливість багатьох морфометричних характеристик, генетичну та морфологічну близькість може бути важко візуально правильно ідентифікувати (рис. 1.3).

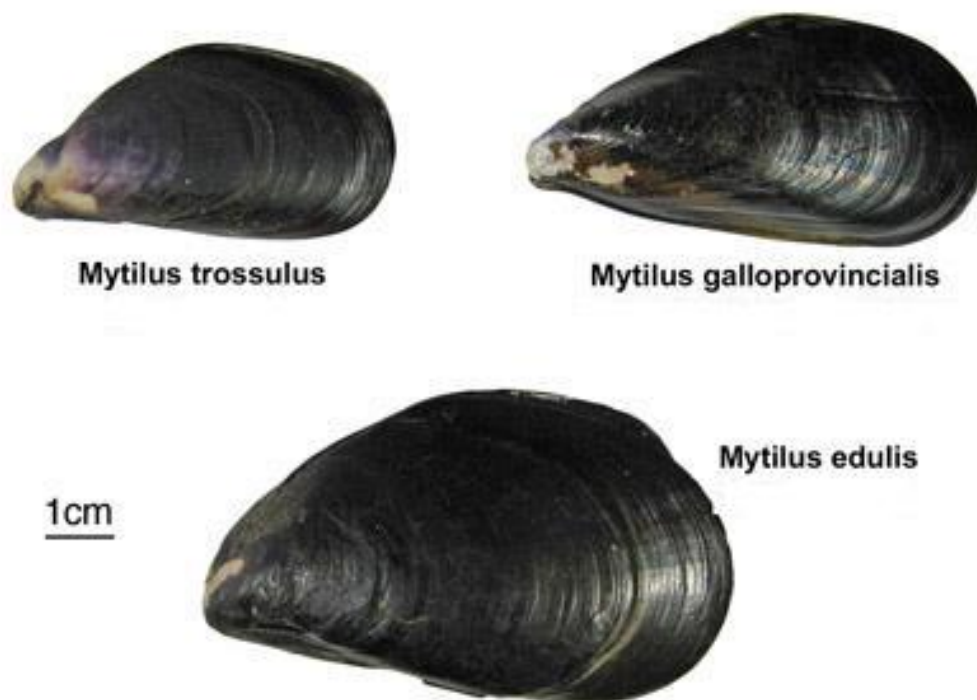


Рис. 1.3. Види блакитних мідій з «видового комплексу *Mytilus*», які ілюструють складність правильної візуальної ідентифікації (згідно Green, 2014).

Багато років систематика мідій роду *Mytilus* ґрунтувалася тільки на морфології їх раковин, при цьому головна увага була приділена взаємовідносинам цих видів між собою. Морфологічні відмінності *M. galloprovincialis* і *M. trossulus* виражені в більшій мірі. Найбільш інформативна ознака для їх поділу – характер розвитку зовнішнього призматичного шару на внутрішній поверхні раковини (Золотарев, 1989). Для більшості особин *M. trossulus* характерні раковини з безперервним призматичним шаром (Золотарев, 1989; Шурова, Золотарьов, 2008). Для особин *M. galloprovincialis*, навпаки, характерна відсутність призматичного шару під лігаментом або він може заходити тільки під задню частину лігамента (Золотарев, Шурова, 1997).

Більш виразні морфологічні відмінності трьох видів мідій (*M. galloprovincialis*, *M. trossulus* і *M. edulis*) можна виявити при використанні багатовимірного морфометричного аналізу з розрахунками індексів, що визначають обрис раковини і форму мускульних відбитків на внутрішній поверхні стулок (Beaumont et al., 1989; McDonald et al., 1991; Inoue et al., 1997).

За результатами дискримінантного аналізу морфологічної характеристики раковини мідій ПЗЧМ було висловлено думку, що окрім особин виду *M. galloprovincialis*, зустрічаються особини, які можна класифікувати як *M. edulis* і *M. trossulus*. Але до проведення відповідних генетико-біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень їх запропоновано розглядати лише як *edulis*- і *trossulus*-подібні морфи (Шурова, 2009, 2013).

1.7. Актуальність генетичних досліджень в аквакультурі мідій

Мідії з роду *Mytilus* є одними з найбільш культивованих двостулкових молюсків. Згідно з даними, опублікованими у 2020 році Продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН (FAO, 2020), світове виробництво мідій в аквакультурі в 2018 році досягло 2,11 мільйона тонн з приблизною вартістю 4,5 мільярда доларів США. У Європейському Союзі ці молюски складають 34% загального виробництва аквакультури. Згідно зі статистичними даними (FAO, 2019), основними культивованими видами в порядку річного виробництва є *M. chilensis* у Південній півкулі, та види *M. edulis* і *M. galloprovincialis* у Північній півкулі. Щодо їх близькоспорідненого виду *M. trossulus* у Північній півкулі, то він часто асоціюється з нижчим виходом м'яса, тоншою шкаралупою та скороченим терміном зберігання порівняно з *M. edulis* (Penney et al., 2007; Beaumont et al., 2008), і вважається небажаним у європейській аквакультурі.

Види *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* та *M. chilensis* здатні схрещуватися між собою, утворюючи так звані гібридні зони (Michalek et al., 2016; Jilberto et al., 2017; Larraín et al., 2012, 2018; Boukadida et al., 2021). Із згаданими таксонами, у Північній півкулі також співіснують види *M. californianus* і *M. coruscus*, які не так легко схрещуються. Вид *M. chilensis*, у Південній півкулі, співіснує з лініями блакитних мідій *M. platensis* і *M. aoteanus* з Нової Зеландії та *M. planulatus* з Австралії, разом із нещодавно інтродукованим *M. galloprovincialis* з Північної півкулі (Zbawicka et al., 2018; Popovic et al., 2020; Oyarzún et al., 2021).

Зважаючи на екологічне та економічне значення цих молюсків, виникла необхідність у генетичній ідентифікації видового складу *Mytilus* sp. у будь-якій півкулі прибережних зон, в розширенні знань про генетичні бар'єри, які визначають поширення цих таксонів, а також про геномні механізми, що керують такими процесами в різних середовищах існування.

Серед заходів, спрямованих на збільшення продуктивності двостулкових молюсків в аквакультурі, є селективне розведення, що дозволяє розвивати спеціалізовані племінні лінії, стійкі до екологічних і патогенних викликів (FAO, 2016; Nascimento-Schulze et al., 2021; Potts et al., 2021). Селекція сприяла виведенню багатьох культивованих водних таксонів (Gjedrem, Rye, 2018), включаючи найважливіших морських двостулкових молюсків, таких як мідії та устриці (Hollenbeck, Johnston, 2018). Селекційні методи варіюють від масового відбору, розмноження від тих, хто росте найшвидше в популяції, до методів із використанням генетичних маркерів.

Найбільш поширені генетичні маркери в спільноті аквакультури включають мітохондріальну ДНК, RFLP, RAPD, AFLP, мікросателітні маркери, SNP та EST. Застосування ДНК-маркерів дозволило швидко прогресувати в аквакультурних дослідженнях генетичної мінливості та інбридингу, визначення батьківства, ідентифікації видів і штамів, а також побудови генетичних карт високої роздільної здатності для видів аквакультури (Liu, Cordes, 2004). В подальшому, геномний відбір за допомогою генетичних досліджень може підвищити точність селекційного розведення, сприяючи високоцільовим результатам, навіть у випадку полігенних ознак, одночасно дозволяючи повністю контролювати генетичні зв'язки нащадків (Meuwissen et al., 2001; Houston et al., 2020).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріал для дослідження

Матеріалом для проведення молекулярно-генетичного аналізу послужили особини мідій виловлені протягом 2018-2022 рр. в шести локаціях північно-західної частини Чорного моря. В якості зовнішніх груп досліджено мідії виловлені з Балтійського, Північного та Ватового морів. Опис локацій вилову зразків особин мідій наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Опис локацій вилову мідій для проведення генетичного аналізу

№ n/n	Море	Місце вилову	Координати	Локація	n	Глибина, м	Рік
1	Чорне	Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ)	46°26'28" пн. ш. 30°46'20" пд. ш.	A	37	4-6	2019- 2020
2		Район Меморіалу 411-ї батареї	46°22'2" пн. ш. 30°43'45" пд. ш.	B	25	4-6	2020
3		Біля о. Зміїний	45°15'18" пн. ш. 30°12'15" пд. ш.	C	26	8	2018
4		Сухий лиман	46°20'22" пн. ш. 30°39'38" пд. ш.	D	24	3-6	2020- 2021
5		Одеська затока (мис «Великий фонтан»)	46°22'35" пн. ш. 30°45'7" пд. ш.	E	29	3-4	2020
6		Тилігульський лиман	46°40'46" пн. ш. 31°9'26" пд. ш.	F	30	4	2021
7	Балтійське	Біля м. Росток, Німеччина	54°10'55" пн. ш. 12°5'18" пд. ш.	G*	38	1	2021
8	Північне	Біля бельгійського узбережжя	51°8'23" пн. ш. 2°39'58" пд. ш.	H*	20	1	2021
9	Ватове	Біля німецького узбережжя	53°41'12" пн. ш. 7°21'27" пд. ш.	J*	14	1	2022

Примітка: n – розмір вибірки (кількість особин), * – локація з контрольними зразками.

До проведення молекулярно-генетичного аналізу молюсків виловлених з ПЗЧМ зберігали у морозильній камері при температурі -28°C , а молюсків з Балтійського, Північного та Ватового морів – в 96% етанолі.

Для проведення біоінформатичного аналізу використовували нуклеотидні послідовності генів адгезивного білка ноги мідій, представлені в базі даних GenBank (NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), пошук яких було проведено за алгоритмом BLAST. Як пошуковий запит використовували послідовність *M. trossulus* (D50553), яка була вказана розробниками праймерів *Me 15 / Me 16* (Inoue et al., 1995). Обрані послідовності наведені в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Опис нуклеотидних послідовностей *Mytilus* взятих в роботу

№ n/n	Організм	Ідентифікатор у базі даних NCBI (ID)	Назва послідовності	Ділянка гена	Довжина, п.н.
1	<i>M. galloprovincialis</i>	HQ257469	13 ген поліфенольного адгезивного білка ноги	Часткова	126
2	<i>Mytilus</i> sp. JHX-2002	AF489933	мРНК попередника білка адгезивного нальоту	Повна	726
3	<i>M. galloprovincialis</i>	D63778	мРНК білка адгезивного нальоту	Повна	2502
4	<i>M. galloprovincialis</i>	KY549937	Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SPT16	Часткова	159
5	<i>M. galloprovincialis</i>	HQ257459	29 ген поліфенольного адгезивного білка ноги	Часткова	126
6	<i>M. galloprovincialis</i>	KY549938	Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SPT6	Часткова	159
7	<i>M. galloprovincialis</i>	HQ257470	11 ген поліфенольного адгезивного білка ноги	Часткова	126
8	<i>M. galloprovincialis</i>	HQ257468	6 ген поліфенольного адгезивного білка ноги	Часткова	126
9	<i>M. galloprovincialis</i>	DQ640590	Ген поліфенольного адгезивного білка Mg11	Часткова	102

Продовження табл. 2.2

10	<i>M. chilensis</i>	DQ640601	Ген поліфенольного адгезивного білка MeI1	Часткова	102
11	<i>M. edulis</i>	KY549934	Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> H23	Часткова	213
12	<i>M. edulis</i>	AY845258	мРНК клону 21 гену білка ноги 1 (fp-1).	Повна	1698
13	<i>M. edulis</i>	KY549936	Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> H12	Часткова	213
14	<i>M. edulis</i>	X54422	Ген поліфенольного адгезивного білка	Повна	4636
15	<i>M. edulis</i>	DQ640586	Ген поліфенольного адгезивного білка MeII2	Часткова	134
16	<i>M. edulis</i>	DQ640587	Ген поліфенольного адгезивного білка MeIII4	Часткова	134
17	<i>M. trossulus</i>	KY549940	Ген адгезивного білка <i>Mytilus</i> SC8	Часткова	201
18	<i>M. californianus</i>	AY960602	Ген білка ноги 1 варіант 2 мРНК	Повна	2019
19	<i>M. californianus</i>	AY960601	Ген білка ноги 1 варіант 1 мРНК	Повна	2199
20	<i>M. coruscus</i>	D63777	мРНК білка матриці адгезивної бляшки	Повна	2816
21	<i>M. trossulus</i>	D50553	Ген адгезивного білка	Часткова	122

Для побудови моделі тривимірної структури адгезивного білка *M. galloprovincialis* використовували повну амінокислотну послідовність довжиною 751 амінокислота (Q27409) обрану на сервері UniProt (<https://www.uniprot.org>).

Матеріалом для проведення генетико-біохімічного аналізу послужили особини мідій виловлені наприкінці жовтня 2020 року в Одеській затоці в районі

Гідробіологічної станції ОНУ імені І. І. Мечникова (локація А) з кам'яної гряди на глибині 6 м на відстані від берега 300 м. В дослід брали особин з довжиною мушлі 65-85 мм. Для проведення ізо-алозимного аналізу відбирали наступні органи: гепатопанкреас, ктенідії (зябра), мантию, ногу та мускули-аддуктори. Під час аналізу індивідуальних особин мідій з Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції ОНУ (локація А, $n = 15$) та району Меморіалу 411-ї батареї (локація В, $n = 15$) використовували гепатопанкреас.

До проведення генетико-біохімічного аналізу виловлених молюсків зберігали у морозильній камері при температурі -28°C . Для дослідження м'яке тіло молюска після легкого відтаювання препарували на поверхні холодогену, щоб запобігти суттєвого нагрівання матеріалу за його обробки (Топтіков та ін., 2017).

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Методи виділення геномної ДНК

За даними літератури відомо, що виділення ДНК і подальша ПЛР-ампліфікація з таксонів молюсків залишаються проблематичними. Основною проблемою вважають наявність полісахаридів, що присутні в тканинах молюсків. Ймовірно, полісахариди разом осідають з ДНК і пригнічують активність ДНК-полімерази (Winperenninckx, 1993; Pereira et al., 2011). У зв'язку з цим, у нашому дослідженні використовували різні методи виділення геномної ДНК із досліджуваних молюсків.

2.2.1.1. Метод виділення ДНК за допомогою СТАВ-буфера

Виділення геномної ДНК з тканин (ктенідії або мантиї) індивідуальних особин мідій проводили за допомогою модифікованого методу з використанням лізуючого буферу зі СТАВ (ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромід) (Winperenninckx et al., 1993). Цей метод є найбільш простим, швидким та економічним для виділення великої кількості зразків.

В пробірку об'ємом 1,5 мл вносили 100 мг матеріалу та додавали 500 мкл лізуючого буферу зі СТАВ (1,4 М NaCl, 20 mM Na₃ЕДТА, 100 mM Трис-НСl, рН 8 при 25°C, 2% СТАВ). Вміст пробірки гомогенізували за допомогою скляної палички та інкубували протягом 1 год при температурі 65°C на термостаті ТЕРМО-48.

На наступному етапі додавали в пробірку 500 мкл хлороформ-ізоамілової суміші, у співвідношенні 24:1. Перемішували вміст пробірки на мініцентрифузі вортекс МЦ-2400-В (ТЗОВ «МІРА», Україна) та центрифугували 5 хв при 13 000 об./хв на мікроцентрифузі «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина). Відбирали верхню фазу (супернатант) у нову пробірку і додавали 500 мкл охолодженого ізопропілового спирту. Суміш пробірки перемішували на вортексі та центрифугували 5 хв при 13 000 об./хв, після чого зливали надосадову рідину.

Отриманий осад нуклеїнових кислот промивали тричі 70% етанолом: перший раз 1000 мкл, наступні два рази – по 500 мкл й центрифугували 2 хв при 13 000 об./хв. Надосадову рідину зливали, після чого осад підсушували при кімнатній температурі й розчиняли в 300 мкл бідистильованій воді. Отриману ДНК зберігали при температурі -20°C.

2.2.1.2. Метод виділення ДНК за допомогою SureFood® PREP Basic

Виділення геномної ДНК з тканин особин мідій проводили з використанням комерційного набору SureFood® PREP Basic (CONGEN Biotechnologie GmbH, Німеччина) відповідно до інструкції виробника (https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/s1052_manual_prep-basic_january2022.pdf).

В реакційну пробірку на 1,5 мл вносили 50 мг матеріалу, додавали 400 мкл лізуючого буферу та 20 мкл протеїнази К. Вміст пробірки гомогенізували за допомогою скляної палички, інкубували при постійному струшуванні на термостаті ТЕРМО-48 протягом 30 хв при 65°C, далі центрифугували 1 хв при 12 000 об./хв на мікроцентрифузі «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина).

На наступному етапі супернатант переносили на фільтраційну колонку, центрифугували 1 хв при 12 000 об./хв, після чого фільтр викидали, а до отриманого

фільтрату додавали 200 мкл буферу, для зв'язування нуклеїнових кислот та перемішували на мініцентрифузі вортекс МЦ-2400-В (ТЗОВ «МІРА», Україна). Отриманий розчин переносили на основну колонку та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 хв, після чого центрифугували 1 хв при 12 000 об./хв. Після центрифугування виливали фільтрат і поміщали колонку назад у приймальну пробірку.

Очищення зв'язаних нуклеїнових кислот на колонці проводили з додаванням 550 мкл буферу для промивки на поверхню колонки та проводили центрифугування 1 хв при 12 000 об./хв, виливали фільтрат і поміщали колонку назад у приймальну пробірку. Процедуру з додаванням буферу для промивки проводили двічі. Видалення залишків етанолу здійснювали центрифугуванням 2 хв при 12 000 об./хв.

Для елюювання нуклеїнових кислот колонку переносили у нову пробірку об'ємом 1,5 мл і додавали 100 мкл попередньо нагрітого (65°C) буферу для елюції. Пробірку інкубували протягом 3 хв при 65°C (без струшування) та центрифугували 1 хв при 10 000 об./хв. Після центрифугування колонку викидали. Отриману ДНК зберігали при температурі -20°C.

2.2.1.3. Метод виділення ДНК за допомогою *Quick-DNA Miniprep Kit*

Виділення геномної ДНК з тканин особин мідій проводили з використанням комерційного набору *Quick-DNA™ Miniprep Kit* (Zymo Research, США) за методикою компанії-виробника (https://files.zymoresearch.com/protocols/_d3024_d3025_quick-dna_miniprep_kit.pdf).

В реакційну пробірку на 1,5 мл вносили 0,25 мг матеріалу та додавали 500 мкл буферу для геномного лізису з β -меркаптоетанолом (0,5%). Вміст пробірки гомогенізували за допомогою скляної палички та інкубували 10-15 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугували 5 хв при 10 000 об./хв на мікроцентрифузі «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина). На колонку відбирали 350 мкл супернатанту і центрифугували 1 хв при 10 000 об./хв.

На наступному етапі додавали по 500 мкл буферу для промивки на колонку, після чого колонку центрифугували 1 хв при 10 000 об./хв, викидали фільтрат і поміщали колонку назад у пробірку. Процедуру з додаванням промивного буферу проводили двічі.

Для елюювання нуклеїнових кислот з колонки, колонку переносили в нову пробірку і додавали 70 мкл буферу для елюції та інкубували протягом 5 хв при кімнатній температурі. Після чого пробірку з колонкою центрифугували 30 сек при 13 000 об./хв. Отриману ДНК зберігали при температурі -20°C.

2.2.2. Молекулярно-генетичний аналіз мідій

2.2.2.1. ПЛР-аналіз із молекулярним маркером *Me 15-16*

Ідентифікацію досліджуваних угруповань мідій проводили за допомогою ПЛР із застосуванням молекулярного маркера *Me 15-16* (табл. 2.3), який розташований в межах гена, що кодує адгезивний білок ноги мідії (Inoue et al., 1995). За даними розробника (Inoue et al., 1995), використаний в нашому експерименті молекулярний маркер *Me 15-16* характеризується трьома продуктами ПЛР, що відрізняються довжиною фрагментів ампліфікації – алелів у різних видів мідій. При ампліфікації з ДНК *M. edulis* визначається фрагмент – 180 п.н., з ДНК *M. trossulus* – фрагмент 168 п.н., з ДНК *M. galloprovincialis* – 126 п.н.

Таблиця 2.3

Комбінація праймерів до гену адгезивного білка мідії

Назва праймера	Послідовність праймерів 5' – 3'	T _v (°C)	n	Довжина алелів в п.н.
<i>Me 15</i>	CCAGTATACAAACCTGTGAAGA	56	3	126
<i>Me 16</i>	TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA			148
				180

Примітка. T_v – температура відпалу праймерів в ПЛР, n – кількість алелів, згідно даних Inoue et al. (1995).

ПЛР-аналіз з використанням молекулярного маркера *Me 15-16* проводили на ампліфікаторі Flex Cycler (Analytik Jena, Німеччина). До складу реакційної суміші входили такі компоненти: 2 мкл 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific), 2,5 мкл буферу для ПЛР 10 × Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific), по 1 мкл праймерів *Me 15* і *Me 16* (Metabion, Німеччина), 0,5 U полімерази Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 50–100 нг ДНК-матриці та стерильна деіонізована вода (до загального об'єму 25 мкл).

Режим ампліфікації для комбінації праймерів *Me 15 / Me 16* наступний (Inoue et al., 1995): початкова денатурація: 95°C – 5 хв; наступні 35 циклів: денатурація – 30 сек при 95°C; відпал – 45 сек при температурі 56°C; елонгація – 1 хв при 72°C; заключна елонгація – 10 хв при 72°C.

2.2.2.2. Мікросателітний аналіз

Генетичну різноманітність та структуру популяції досліджуваних особин мідій вивчали за допомогою мікросателітного аналізу. Для визначення алельних та генотипових характеристик за мікросателітними (МС) локусами геному мідій було обрано чотири пари праймерів, які наведено в табл. 2.4.

ПЛР-аналіз МС-локусів геному мідій проводили на ампліфікаторі Flex Cycler (Analytik Jena, Німеччина). До складу реакційної суміші входили такі компоненти: 2 мкл 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific), 2,5 мкл буферу для ПЛР 10 × Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific), по 1 мкл прямого та зворотнього олігонуклеотидних праймерів (Metabion, Німеччина), 0,5 U полімерази Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 50-100 нг ДНК-матриці та стерильна деіонізована вода (до загального об'єму 25 мкл). Ампліфікацію з праймерами до МС-локусів проводили згідно рекомендацій авторів (Gardeström et al., 2008; Ouagajjou et al., 2011) з внесеними модифікаціями (табл. 2.5).

Таблиця 2.4

Послідовності праймерів до мікросателітних локусів мідій роду *Mytilus*

Локус	Мотив послідовності, що повторюється	Послідовність праймерів (5' – 3')	Джерело послідовності	Сиквенс МС в GenBank	Література
<i>Mch 5</i>	(CTGT) ₆	F: CTG TTG CTC AAT CCT TGC AG R: GCG AAA AAT AGG AAA AGA TAA GCA	<i>M. chilensis</i>	JF894127	Ouagajjou et al. (2011)
<i>Mch 8</i>	(CA) ₆	F: AAA CCT AAG TGC TGT TCA T R: CAT TTA TTC GTC TGT CAC A		JF894130	
<i>MT 203</i>	(CA) ₈	F: GTT TTC CGA ATG GCG AGA TA R: ACA ACC AGT TCA ATA GCG ACA	<i>M. trossulus</i>	BV725482	Gardeström et al. (2008)
<i>MT 282</i>	(GT) ₉	F: TGC CAC ATT GTT TTC AAG GA R: TTC ACG ACA GCG ACT ATG AAA		BV725484	

Таблиця 2.5

Умови проведення ПЛР

Назва праймера	Початкова денатурація	Денатурація	Відпалювання	Елонгація	Заклучна елонгація	Кількість циклів
<i>Mch 5</i>	95°C – 5 хв	94°C – 1 хв	55°C – 40 с	72°C – 1 хв	72°C – 10 хв	35
<i>Mch 8</i>	95°C – 5 хв	94°C – 1 хв	51°C – 40 с	72°C – 1 хв	72°C – 10 хв	35
<i>MT 203</i>	95°C – 5 хв	95°C – 30 сек	50°C – 45 с	72°C – 1 хв	72°C – 10 хв	35
<i>MT 282</i>	95°C – 5 хв	95°C – 30 сек	50°C – 45 с	72°C – 1 хв	72°C – 10 хв	35

2.2.2.3. Електрофорез продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі

Продукти, отримані під час реакції ампліфікації ДНК, фракціонували методом вертикального електрофорезу в 7% поліакриламідному гелі (ПААГ), розмірами 200×200×0,75 мм, у 1×ТБЕ буфері відповідно до (Maniatis et al., 1982). Для приготування одного гелю використовували: 3,55 мл 10×ТБЕ буферу (10,8 г Трис; 5,5 г борної кислоти; 0,75 г Трилону Б на 100 мл H₂O), 8,22 мл 30% розчину акриламиду (29 г акриламиду; 1 г бісакриламиду на 100 мл дистильованої води) та 23,22 мл дистильованої води. Потім відбирали 2 мл розчину на «смужку», і додавали до нього згущувачі: 100 мкл 10% розчину персульфат амонію та 10 мкл 1% ТЕМЕД (тетраметилетилендіамід). Після полімеризації «смужки», до розчину, що залишився додавали 350 мкл 10% розчину персульфат амонію та 35 мкл 1% ТЕМЕД. Перед нанесенням на електрофорез 10 мкл реакційної суміші змішували з 3 мкл буферного розчину наступного складу: 0,25% бромперфенолового синього, 40% (вага/об'єм) сахарози, дистильована вода. Електрофорез проходив при напрузі 300 В, протягом 2,5 год.

2.2.2.4. Візуалізація продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі за допомогою фарбування з використанням AgNO₃

Візуалізацію продуктів ампліфікації в ПААГ проводили шляхом фарбування нітратом срібла відповідно до (Promega, 1999). Поліакриламідний гель поміщали на 5 хв у 10% розчин етанолу. Потім переносили гель на 3 хв в 1% розчин HNO₃ та промивали кілька разів дистильованою водою. Витримували протягом 20 хв у темряві в 0,012 М розчині AgNO₃, після чого промивали кілька разів дистильованою водою. Далі заливали гель відновлюючим розчином (6 г Na₂CO₃, 100 мкл 0,019% формаліну, 200 мкл дистильованої води) та інкубували перемішуючи до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Після забарвлення гель промивали кілька разів дистильованою водою. Для фіксації забарвлення продуктів ампліфікації гель тримали 2 хв у 10% оцтовій кислоті і на завершення

промивали кілька разів дистильованою водою. Гель зберігали між двома шарами прозорої поліетиленової плівки.

2.2.2.5. Документування та аналіз гелів-електрофореграм ПЛР-продуктів

Документування гелів-електрофореграм ПЛР-продуктів проводили на сканері Hewlett Packard Scanjet 4400c з подальшим збереженням зображення в пам'яті комп'ютера. Для визначення розмірів продуктів ампліфікації використовували комп'ютерну програму GelAnalyzer 19.1 (<http://www.gelalyzer.com>) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc), в якості маркеру молекулярної маси застосовували *pUC 19 / Msp I* (Thermo Scientific).

Використана в роботі програма GelAnalyzer 19.1 охоплює процес аналізу починаючи від автоматичного знаходження смуги – фрагмента ампліфікації на цифровому зображенні геля до розрахунків молекулярної маси фрагментів ампліфікації у п.н. відносно маркеру *pUC 19 / Msp I*. Наведемо приклад визначення розміру алеля за МС-локусом *MT 203* для експериментального зразка особи мідії виловленої з Одеської затоки ПЗЧМ (рис. 2.1).

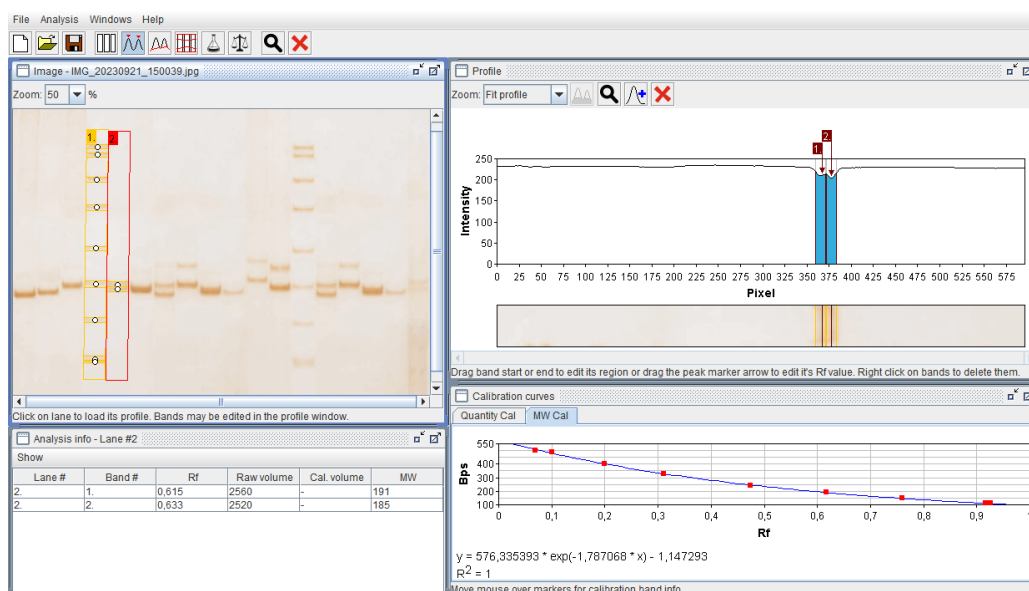


Рис. 2.1. Визначення розмірів фрагментів ампліфікації за локусом *MT 203* для зразка ДНК особи мідії з Одеської затоки за допомогою комп'ютерної програми GelAnalyzer 19.1.

Стадійність опрацювання зображення геля та методика визначення молекулярної маси ПЛР-продуктів відносно маркеру молекулярної маси наводиться за посиланням (<https://docplayer.net/168670139-Gelalyzer-19-1-user-manual.html>).

2.2.2.6. Статистична обробка результатів молекулярно-генетичного аналізу

Статистичну обробку результатів МС-аналізу проводили за допомогою комп'ютерної програми GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012). Для досліджуваних особин мідій ($n = 188$) за кожним МС-локусом було розраховано частоти алелів. Перевірку нормальності розподілу частот алелів за мікросателітними локусами виконували за допомогою критерію Шапіро-Уїлка з використанням онлайн-калькулятора Statistics Kingdom (<https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>). Далі частоти алелів для вибірок мідій з досліджуваних локацій порівнювали за допомогою методу непараметричної статистики – визначали U-критерій Манна-Уїтні, як рекомендовано Климчук (2009).

Для кожного досліджуваного МС-локусу було розраховано такі популяційно-генетичні параметри: кількість алелів на локус (N_a), спостережувану (H_o) та очікувану (H_E) гетерозиготність, індекс фіксації (F) згідно з (Hartl, Clark, 1997); ефективну кількість алелів (N_e) та інформаційний індекс (I) згідно з (Brown, Weir, 1983). Коефіцієнт інбридингу субпопуляції відносно всієї загальної популяції (F_{ST}) розраховували за формулою (Hartl, Clark, 1997):

$$F_{ST} = \frac{(H_T - H_S)}{H_T},$$

де H_S – очікувана гетерозиготність у субпопуляціях при панміксії (вільне схрещування роздільностатевих особин); H_T – очікувана гетерозиготність у всій популяції при панміксії. Індокси генетичної подібності (I) між угрупованнями мідій та відповідні їм величини генетичних дистанцій (D) розраховували за Несем (Hedrick, 2000).

На основі розрахованих частот алелів МС-локусів із застосуванням програми PAST (Hammer et al., 2001) побудували дендрограму подібності досліджуваних угруповань мідій із використанням методу UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) (Sneath, Sokal, 1973).

2.2.3. Біоінформатичний аналіз адгезивного білка мідій

Мультиплексне вирівнювання взятих в роботу нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка мідій (див. табл. 2.2) проводили за допомогою алгоритму MAFFT (Madeira et al., 2019). Філогенетичне дерево було побудоване у програмному забезпеченні MEGA (Kumar et al., 2018) із застосуванням методу UPGMA (Sneath, Sokal, 1973). Для оцінки достовірності побудованого дерева проводили бутстреп (bootstrap) аналіз (Hillis, Bull, 1993) при 1000 ітерацій.

Для пошуку повної амінокислотної послідовності адгезивного білка ноги мідії середземноморської *M. galloprovincialis*, який кодується геном *Fp1*, використовували сервер UniProt (<https://www.uniprot.org>). За допомогою програмного інструменту ProtParam (ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)), для знайденої послідовності розраховували молекулярну масу та амінокислотний склад досліджуваного білка.

На онлайн-платформі I-TASSER (Yang, Zhang, 2015) із обраної на сервері UniProt амінокислотної послідовності (Q27409) була побудована модель тривимірної структури гена адгезивного білка ноги мідії. Сервер I-TASSER дозволяє виявити білки-шаблони зі схожими складками (або супервторинними структурами) з бібліотеки PDB за допомогою LOMETS, локально встановленого методу метапотоків. Повнорозмірні моделі структури білка будуються шляхом повторної збірки структурних фрагментів із шаблонів з використанням обміну репліками за допомогою моделювання Монте-Карло. Побудовану тривимірну модель структури досліджуваного білка за допомогою серверу I-TASSER було порівняно з моделлю спрогнозованою програмою AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q27409>).

2.2.4. Генетико-біохімічний аналіз мідій

2.2.4.1. Методи екстракції ензимів

Екстракцію ензимів проводили за схемою, запропонованою В. А. Топтіковим зі співавторами (2017). Перед отриманням екстрактів з ізольованих органів їх багаторазово обробляли ацетоном. Завдяки цій процедурі значно зменшувалась кількість жирних сполук та пігментів, які перешкоджають електрофоретичному розділенню білків та вирівнювалася кількість вологи у різних тканинах. Вказаний матеріал у подальшому висушували в морозильній камері. Після висушування дослідну тканину зважували й ретельно розтирали в охолодженій порцеляновій ступці.

Отриманий матеріал обробляли екстрагуючим буфером наступного складу: 0,05 М Трис-НСІ (рН 6,8), 15% цукроза, 0,01% дитіотреїтол, 0,01% аскорбінова кислота, 0,01% натрієва сіль ЕДТА, 1% тритон Х-100 та декілька крупинок бромфенолового синього. Співвідношення: оброблена ацетоном тканина (мг) : буфер (мкл) складало 1 : 10. Проби розтирали з буфером у центрифужних пробірках та інкубували протягом однієї ночі при температурі +4°C та 3-5 разів піддавали заморожуванню-відтаюванню.

Перед аналізом екстракти центрифугували при 10 000 об./хв на протязі 20 хв для видалення дебрису. Для електрофорезу відбирали 7-30 мкл супернатанту. До наступного аналізу проби зберігали в морозильній камері.

2.2.4.2. Електрофоретичне фракціонування білків

Вертикальний електрофорез білків проводили при кімнатній температурі в пластинах гелю розміром 150×150×1 мм. Для фракціонування білків у ПААГ використовували систему Девіса (Davis, 1964) та трис-борат-цитратну буферну систему (ТБЦ) (Manchenko, 2003) з застосуванням концентруючого гелю і без нього.

Для приготування гелів методом Девіса використовували концентрований розчин мономерів, концентрований буфер для робочого гелю, концентрований буфер для гелю, концентрований електродний буфер; сухий порошок амонію персульфату, ТЕМЕД, дистильовану воду.

Концентрований розчин мономерів: 30 г – акриламід, 0,8 г – метилен-біс-акриламід, реактиви розчиняли у дистильованій воді до кінцевого об'єму 100 мл.

Концентрований буфер (1,5 М Трис-НСІ буфер, рН 8,9) для робочого гелю, у системі Девіса: 18,3 г – Трис основа, 24 мл – 1 М НСІ, 0,3 г – динатрієва сіль ЕДТА (модифікація), реактиви розчиняли у дистильованій воді до кінцевого об'єму 100 мл.

Концентрований буфер для гелю у системі Девіса: 5,98 г – Трис основа, 48 мл – 1 М НСІ, реактиви розчиняли у дистильованій воді до кінцевого об'єму 200 мл, рН розчину доводили до 6,7-6,8.

Концентрований електродний буфер у системі Девіса: 6,06 г – Трис основа, 22,5 г – гліцин, 0,68 г – динатрієва сіль ЕДТА (модифікація), реактиви розчиняли у дистильованій воді до кінцевого об'єму 1000 мл, рН розчину доводили до 8,3. При використанні розбавляли водою у 10 разів.

Електродний буфер для трис-борат-цитратної буферної системи: 0,0625 М – Трис, доводили борною кислотою до рН 9,0.

Буфер робочого гелю для трис-борат-цитратної буферної системи: 0,19 М – Трис, доводили лимонною кислотою до рН 7,0.

З метою визначення поліморфізму і тканинного розподілу в п'яти органах захисних ензимів, що захищають мідію від різних несприятливих впливів довкілля, в нашому дослідженні було використано 13 біохімічних маркерів (ензимів), наведено в табл. 2.6.

Електрофорез проводили при 15 мА і 110 В, поки фронт барвника не переміщувався від старту на відстань біля третини гелю, після чого силу та напругу струму збільшували до 30 мА і 260 В. Загальна тривалість електрофорезу складала 4-5 годин. По закінченню гелі обробляли щодо виявлення певної ензимної активності.

Захисні ензими, які використовували для дослідження *M. galloprovincialis*

№ з/п	Назва ензима	Локус, який кодує ензим	Шифр КФ	Концентрація робочого гелю, %	Особливості приготування ПААГ		Назва буферної системи	Кількість зразку нанесеного на гель, мкл
					Концентрований гель	Крохмаль		
Ензими антиоксидантної системи								
1	Супероксиддисмутаза	<i>SOD</i>	1.15.1.1	8,5	+	–	Девіса	15
2	Фероксидаза	<i>CP</i>	1.16.3.1	8,8	+	+	ТБЦ	15
3	Глутатіонпероксидаза	<i>GPx</i>	1.11.1.9	10	+	–	Девіса	20
4	Пероксидаза	<i>PER</i>	1.11.1.7	7,5	+	–	ТБЦ	15
5	Пероксиредоксини	<i>PRX</i>	1.11.1.15	8,5	+	+	Девіса	15
6	Каталаза	<i>CAT</i>	1.11.1.6	6,5	+	+	ТБЦ	20
7	Глутатіонредуктаза	<i>GSR</i>	1.6.4.2	8,8	–	–	ТБЦ	20
8	НАДН-оксидаза	<i>OXN</i>	1.6.3.3	8,8	+	–	ТБЦ	10
9	НАДФН-оксидаза	<i>NOX</i>	1.6.99.6	8,8	+	–	ТБЦ	10
Ензими біотрансформації								
10	Карбоангідраза	<i>CA</i>	4.2.1.1	8,5	–	+	Девіса	15
11	Амінооксидаза	<i>AMOX</i>	1.4.3.6	10	–	–	Девіса	20
12	Естерази	<i>EST</i>	3.1.1-	10	–	–	Девіса	7*, 13*
13	Глутатіон-S трансфераза	<i>GST</i>	2.5.1.18	10	–	+	Девіса	30

Примітка. «+» – з концентрованим гелем, з крохмалем; «–» – без концентрованого гелю, без крохмалю; 7* мкл – гепатопанкреас; 13* мкл – ктенідії, мантія, нога, мускул-аддуктор.

2.2.4.3. Візуалізація білкових фракцій на електрофореграмах

2.2.4.3.1. Виявлення супероксиддисмутазної активності

Для виявлення супероксиддисмутази проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 8,5% ПААГ. У лунки концентруючого гелю вносили 15 мкл проби. Виявлення ензиму здійснювали відповідно до (Manchenko, 2003). Після електрофорезу гель інкубували 20 хв в темноті при кімнатній температурі в забарвлюючому розчині наступного складу: 100 мл – 0,01 М калій-фосфатний буфер рН 7,8, 20 мг – нітротетразолій синій (НСТ), 20 мг – феназинметасульфат (ФМС), 20 мг – $MgCl_2$. На наступному етапі розчин зливали і гель опромінювали протягом 1-2 хв джерелом ультрафіолетового світла. Після процедури опромінення гель знову заливали тим же забарвлюючим розчином. Зазначену обробку гелю повторювали декілька разів до появи контрастного забарвлення. Пластини ПААГ мали темно-фіолетове забарвлення, окрім зон з ізоформами супероксиддисмутази, які залишаються прозорими унаслідок перетворення молекул супероксид-аніону ($*O_2$) до перекису водню (H_2O_2) і молекулярного кисню (O_2), роблячи потенційно шкідливий супероксид-аніон менш небезпечним.

2.2.4.3.2. Виявлення фероксидазної активності

Для виявлення фероксидази проводили електрофорез у буферній системі ТБЦ (Manchenko, 2003) в 8,8% ПААГ з крохмалем (0,5%). У лунки концентруючого гелю вносили 15 мкл проби. Фероксидазну активність виявляли за окисненням пара-фенілендіаміну (Manchenko, 2003). Після електрофорезу пластини ПААГ витримували 20 хв в дистильованій воді, щоб знизити рН. Після чого інкубували при 37°C в забарвлюючому розчині (100 мл – 40 мМ ацетатний буфер, рН 5,5, 100 мг – пара-фенілендіамін) до появи смуг коричневого кольору у зоні розташування ензиму.

2.2.4.3.3. Виявлення глутатіонпероксидазної активності

Для виявлення глутатіонпероксидазної активності проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 10% ПААГ. У лунки концентруючого гелю вносили 20 мкл проби. Виявлення глутатіонпероксидази здійснювали відповідно до (Manchenko, 2003). Спочатку гель інкубували на гойдалці 20 хв у розчині наступного складу: 50 мМ калій-фосфатний буфер рН 7,8, глутатіон відновлений (4 мг/мл) та 2 мМ H_2O_2 . Після чого гель переносили у забарвлюючий розчин (0,01 М калій-фосфатний буфер, рН 7,8 – 100 мл; НСТ – 15 мг; ФМС – 15 мг; MgCl_2 – 20 мг) до появи безбарвних смуг на синьо-фіолетовому фоні.

2.2.4.3.4. Виявлення пероксидазної активності

Для виявлення пероксидази проводили електрофорез у буферній системі ТБЦ (Manchenko, 2003) в 7,5% ПААГ. У лунки концентруючого гелю вносили 15 мкл проби. Пероксидазу проявляли за методом Лойда (Lojda, 1967) у G-наді-оксидазної реакції (Греффа наді-реакція, оксидазна реакція тканинна). Гель витримували в розчині (0,1% N-феніл-*n*-фенілендіамін, 0,1% 1-нафтол, 0,3% H_2O_2) до появи синіх смуг у зоні розташування ензиму.

2.2.4.3.5. Виявлення активності пероксиредоксинів

Для визначення пероксиредоксинів застосовували раніше описану нами методику (Toptikov et al., 2022). Проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 8,5% ПААГ з доданням крохмалю (0,5%). У лунки концентруючого гелю вносили 15 мкл проби. Після електрофорезу гелі занурювали на 20 хв у 1 мМ розчин дитіотреїтолу в натрій-ацетатному буфері рН 7,0. Використаний розчин зливали і промивали гель водою. Після промивки гель витримували 20 хв у свіжоприготовленому розчині пероксиду водню (0,03%) і знову промивали водою, після чого гель обробляли 0,045 М розчином КJ. Зони

ензиму виявлялися як безкольорові смуги на синьому тлі. Документування гелю здійснювали одразу.

2.2.4.3.6. Виявлення каталазної активності

Каталазу виявляли після електрофорезу у буферній системі ТБЦ (Manchenko, 2003) в 6,5% ПААГ з доданням до розчину робочого гелю розчинний крохмаль до концентрації 0,5%. У лунки концентруючого гелю вносили 20 мкл проби. Прояв ензиму здійснювали на основі реакції крохмалю з йодом у присутності перекису водню і тіосульфату (Manchenko, 2003). Спочатку гель витримували 7-10 хв у 0,01% розчині H_2O_2 . Швидко промивали дистильованою водою та заливали на 5 хв забарвлюючим розчином наступного складу: 100 мл 0,0045 М КJ, 10 капель крижаної оцтової кислоти. Зони каталазної активності виявлялися у вигляді білих смуг на синьому фоні. Після фарбування гелі промивали водою і одразу документували. У ділянках гелю, де локалізується каталаза, пероксид водню руйнується ферментативно ензимом, утворюючи білі смуги у гелі. Під впливом йодиду калію, там де пероксид водню не руйнується, йодид окислюється до йоду, утворюючи інтенсивний синій крохмально-йодний хроматофор.

2.2.4.3.7. Виявлення глутатіонредуктазної активності

Для виявлення глутатіонредуктази проводили електрофорез у буферній системі ТБЦ (Manchenko, 2003) в 8,8% ПААГ. У лунки гелю вносили 20 мкл проби. Виявлення глутатіонредуктази здійснювали відповідно до (Manchenko, 2003). Гель інкубували в темряві у забарвлюючому розчині (50 мл 0,25 М Трис-НСl буфер, рН 7,5, 104 мг – 3,4 мМ глутатіон окиснений, 21 мг – 0,5 мМ відновлений NADPH, 56 мг – 3 мМ ЕДТА, 20 мг – ФМС, 100 мкл – ТЕМЕД) до появи синіх смуг у зоні розташування ензиму.

2.2.4.3.8. Виявлення НАДН- та НАДФН-оксидазної активностей

Для виявлення НАДН-оксидази проводили електрофорез у буферній системі ТБЦ (Manchenko, 2003) в 8,8% ПААГ. У лунки концентруючого гелю вносили 10 мкл проби. Виявлення НАДН-оксидази здійснювали відповідно до (Manchenko, 2003). Гель інкубували в темряві у забарвлюючому розчині (50 мл – 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,8), 40 мг – NADH відновлений; 30 мг – НСТ; 4 мг – ФАД) до появи темно-синіх смуг у зоні розташування ензиму. НАДФН-оксидазу виявляли за такою ж методикою, як й НАДН-оксидазу. Тільки замість NADH у розчин додавали таку ж кількість NADPH відновленого.

2.2.4.3.9. Виявлення карбоангідразної активності

Для виявлення карбоангідрازی проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 8,5% ПААГ з крохмалем (0,5%). У лунки гелю вносили 15 мкл проби. Карбоангідразу виявляли за методом із солями металів (Meijer, Влоет, 1966). Окремо готували два розчини для виявлення активності карбоангідрازی: розчин А (до 1,0 мл 0,1 М CoSO_4 додають 6,0 мл 0,05 М H_2SO_4) та розчин Б безпосередньо перед використанням (розчиняють 1 г NaHCO_3 у 50 мл 0,1 М Na_2SO_4). Перед інкубацією розчин Б вливали у розчин А і цією сумішшю заливали гель, витримували гель 1,5-2 год при температурі 18-20°C. Потім протягом 2 хв промивали гель у дистильованій воді та обробляли 1 хв розведеним розчином $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. Багаторазово гель промивали водою. У місцях розташування ензиму виникає чорний або коричневий осад сульфиду кобальту.

2.2.4.3.10. Виявлення амінооксидазної активності

Для виявлення амінооксидази проводили електрофорез у буферній системі Девіса в 10% ПААГ. У лунки гелю вносили 20 мкл проби. Виявлення амінооксидази здійснювали відповідно до (Manchenko, 2003). Для готування

забарвлюючого розчину змішували 40 мл 65 мМ фосфатного буферу, рН 6,8 з 10 мл розчину 150 мг спермідину розчиненого в 10 мл води. Інкубували гель у розчині для фарбування в темряві при 37°C до появи темно-синіх смуг, що вказують на локалізацію активності амінооксидази в гелі. Після чого промивали гель у воді та фіксували в 25% етанолі.

2.2.4.3.11. Виявлення естеразної активності

Для виявлення неспецифічних естераз проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 10% ПААГ. В залежності від органного походження екстракту в лунки гелю вносили певну кількість матеріалу: гепатопанкреас – 7 мкл; ктенідії, мантія, нога, мускул-аддуктор – 13 мкл. Неспецифічні естерази виявляли за реакції азосполучення продуктів гідролізу нафтілацетатів з міцним синім (RR) (Manchenko, 2003). Після проходження електрофорезу, гель промивали 3 рази в дистильованій воді по 20 хв. Окремо готували два розчини щодо азотосполучення: розчин А (10 мг – α -нафтилпропіонат та 40 мг – β -нафтилацетат, які розчиняли в окремих колбах за допомогою ацетону) та розчин Б (40 мг RR розчинювали в диметилсульфоксиді (ДМСО) та додавали 2 мл ізопропанолу). Отриманий розчин Б добре перемішували, після повного розчинення RR додавали 0,3-0,5 мл 37% формальдегіду, щоб зменшити неспецифічне фонове фарбування гелю. Безпосередньо перед нанесенням на гель розчини А та Б змішували в 50 мл ацетатного буферу, рН 7,0 (1,23 г – $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$, об'єм доводили дистильованою водою до 300 мл). Далі гель інкубували в темряві при 37°C до появи темно-коричневих (α -естерази) та червоних (β -естерази) смуг.

2.2.4.3.12. Виявлення глутатіон-S трансферазної активності

Для виявлення глутатіон-S трансферази проводили електрофорез у буферній системі Девіса (Davis, 1964) в 10% ПААГ з крохмалем (0,5%). У лунки гелю вносили 30 мкл проби. Виявлення глутатіон-S трансферази здійснювали відповідно

до (Manchenko, 2003). Окремо готували два розчини для виявлення активності глутатіон-S трансферази: забарвлюючий розчин А (50 мл – 0,1 М калій-фосфатний буфер, рН 6,5, 35 мг – відновлений глутатіон, 20 мл – 1-хлор-2,4-динітробензол (розчиняли в ДМСО)) та розчин Б (5 мМ I₂ (1%), 5 мМ KJ₂ (1%) в 50 мл 0,1 М трис-НСl, рН 8,0). Спочатку інкубували гелі у розчині А при 37°C протягом 10 хв при легкому перемішуванні, після чого промивали гель водою та інкубували при кімнатній температурі в розчині Б до появи синіх смуг на білому фоні.

2.2.4.4. Документування та аналіз гель-електрофореграм протеїнів

Документування гелів проводили на сканері Hewlett Packard Scanjet 4400с з подальшим збереженням зображення в пам'яті комп'ютера. Кількісний аналіз електрофореграм проводили використовуючи спеціальну комп'ютерну програму АНАИС 1.15 (Рыбалка, Пожарский, 2004). За допомогою програми АНАИС 1.15 для кожної ММФ досліджених ензимів визначали величину відносної електрофоретичної рухливості (*R_f*) та експресивність (площу і інтенсивність забарвлення відповідних смуг на електрофореграмах в умовних одиницях).

Для проведення аналізу, в програму АНАИС 1.15 завантажували цифрове зображення електрофореграми у форматі *.bmp, де зображення переводилося у графічну форму у вигляді кривих, на яких смуги виглядали як піки, висота та площа під цими піками відповідала інтенсивності забарвлення смуг. Приклад аналізу ензимних електрофореграм з використання програми АНАИС 1.15 наведено на рис. 2.2.

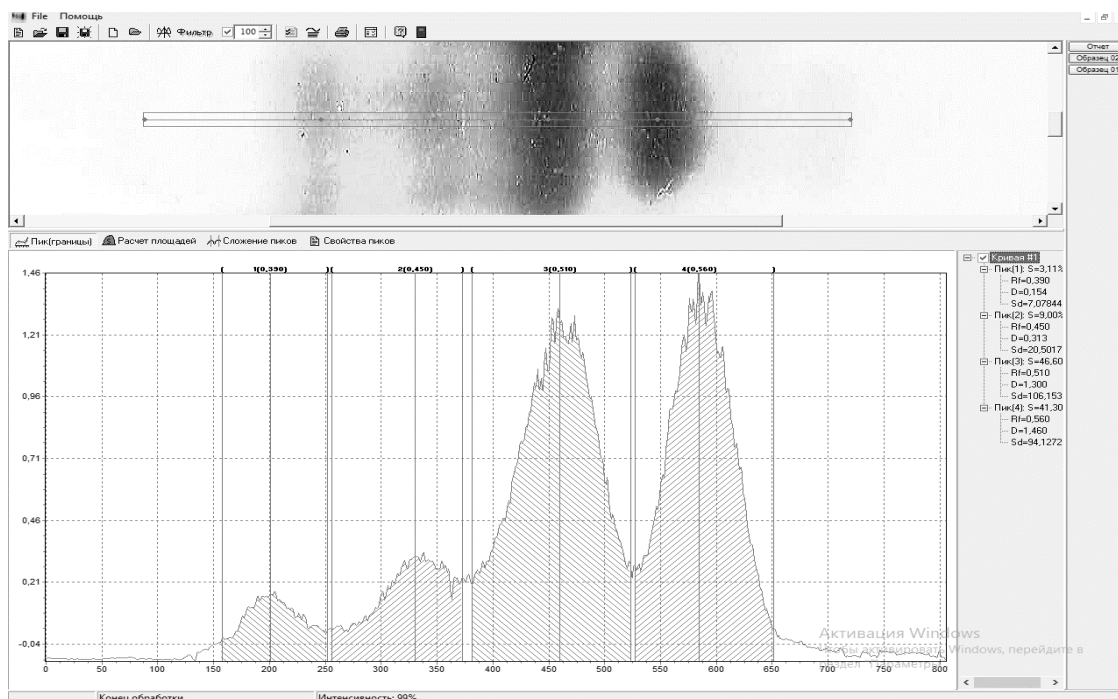


Рис. 2.2. Визначення відносної електрофоретичної рухливості та експресивності ізоформ супероксиддисмутази у зразку мантії мідій за допомогою комп'ютерної програми АНАИС 1.15.

Відносно до смуг (рис. 2.2), програма АНАИС 1.15, що має функцію денситометрії, малювала криву – профіль інтенсивності з піками, найбільш інтенсивно фарбованими ділянками гелю, що відповідають ізоформам супероксиддисмутази.

Для кожного піку програма розраховувала відносну електрофоретичну рухливість (R_f) та оптичну густину в пікселях з обліком максимального значення піку та площі під піком. Площа під кожним піком відповідала загальній кількості (загальній активності) ензиму у даній смузі. Відношення цієї площі до площі під усім спектром відповідала питомій відносній кількості (активності) даної форми ензиму у всьому спектрі.

Визначення відносної частки кожного з компонентів аналізованого зразка проводилося за формулою:

$$s\%_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i},$$

де S_i – площа графіка, обмежена i -тим піком і віссю абсцис.

2.2.4.5. Статистична обробка результатів генетико-біохімічного аналізу

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel та з використанням програмного забезпечення Statistica 14.0 (TIBCO, США). Отримані дані аналізували двофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA). Для використання ANOVA було проведено перевірку нормальності розподілу активності досліджуваних ензимів за допомогою критерію Шапіро-Уїлка з використанням онлайн-калькулятора Statistics Kingdom (<https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>).

Для проведення кореляційного аналізу, розраховану активність ензимів в кожному органі замінювали на ранги, ранжуючи при цьому органи від більшої до меншої активності відповідного ензиму. Критичний коефіцієнт кореляції рангів Спірмена для 5 корелюючих пар становить $r = 0,94$ при рівні достовірності $p = 0,05$. Значення коефіцієнту рангової кореляції Спірмена розраховували за формулою (Атраментова, Утєвська, 2007):

$$r_s = 1 - \frac{6}{n(n^2 - n)} \sum d^2,$$

де $d = R_x - R_y$ – різниця між рангами пов'язаних значень ознак x і y , n – кількість парних членів ряду або об'єм вибірки. Табличні значення $\frac{6}{n(n^2 - n)}$ наведено в (Атраментова, Утєвська, 2007).

РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІДІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА *Me 15-16*

3.1. Визначення видової приналежності мідій північно-західного регіону Чорного моря за результатами молекулярно-генетичного аналізу

Для ідентифікації представників роду *Mytilus* широко використовується молекулярний маркер *Me 15-16* (Hamer et al., 2013; Larraín et al., 2019; Coolen et al., 2021; Boukadida et al., 2021), розроблений до неповторювальної області гена *Fp1* адгезивного білка (Inoue et al., 1995), останній який дозволяє мідіям прикріплюватися до різноманітних субстратів.

Досліджуваний адгезивний білок ноги мідій був виділений з виду *M. edulis* і містить повтори мотиву декапептиду АКPSYP*P*TY*K, де P* та Y* позначають гідроксипролін та 3,4-дигідроксифенілаланін (ДОФА), відповідно, та гексапептидний мотив АКРТY*K. Первинна структура адгезивного білка була визначена після клонування відповідних генів. Показано (Filpula et al., 1990), що адгезивний білок ноги складається з відносно короткого неповторюваного домену та довгого повторюваного домену. Повторюваний домен містить більше 70 повторів декапептиду та 13 або 14 гексапептидних повторів, але кількість і характер розподілу мотивів змінюються навіть в межах одного виду (Filpula et al., 1990).

Амінокислотна послідовність досліджуваного білка у *M. galloprovincialis* також складається з неповторюваних і повторюваних доменів, але в обох доменах наявні значні відмінності в порівнянні з цим білком у *M. edulis*. Основна відмінність у повторюваному домені полягає в тому, що амінокислотна послідовність *M. galloprovincialis* містить 62 декапептидні повтори без гексапептидного мотиву, неповторюваний домен має делецію 18 амінокислот.

Inoue зі співавторами (Inoue et al., 1995) показали, що довжина фрагментів, ампліфікованих з неповторюваної області цього гена, є специфічною для кожного виду мідій, а довжина повторюваної області є дуже різноманітною навіть у межах одного виду. Було зазначено, що неповторювану область можна використовувати як

діагностичний маркер, до цієї ділянки гена було розроблено праймери (*Me 15 / Me 16*), які було застосовано для ідентифікації трьох видів мідій *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. edulis*, за видоспецифічними продуктами ампліфікації – 126 п.н., 168 п.н. та 180 п.н. відповідно (Inoue et al., 1995). Крім того, було продемонстровано, що розроблені праймери дозволяють виявляти та ідентифікувати гібриди вказаних видів.

Слід зазначити, що на сьогоднішній день за допомогою молекулярного маркера *Me 15-16* у поєднанні з рестрикційним ензимом *Aci I* можна відрізнити між собою вид *M. chilensis* від виду *M. galloprovincialis* Північної півкулі (Santaclara et al., 2006).

У нашому дослідженні за результатами ПЛР-аналізу із застосуванням діагностичного маркера *Me 15-16* було виявлено ідентичні за довжиною фрагменти ампліфікації у 171 досліджуваної особини мідій з ПЗЧМ (рис. 3.1).

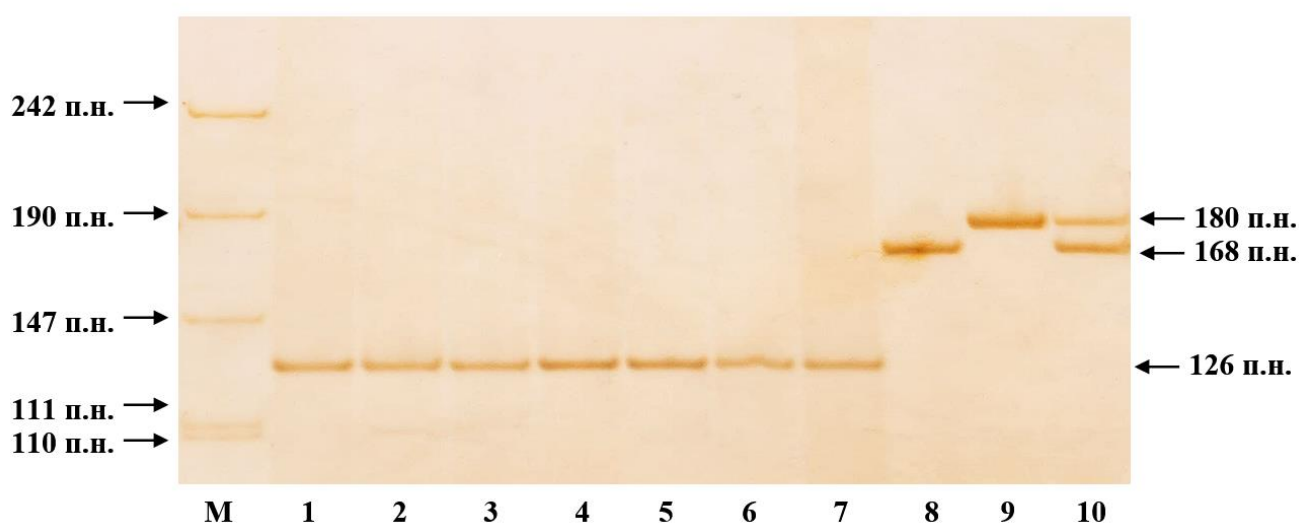


Рис. 3.1. Електрофореграма розподілення у 7% ПААГ продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР із застосуванням праймерів *Me 15 / Me 16* й ДНК мідій з північно-західної акваторії Чорного та Балтійського морів: М – маркер *pUC 19 / Msp I*; 1-7 – зразки мідій з трьох локацій Чорного моря: 1-2 – зразки мідій з локації А (Одеська затока); 3-4 – з локації С (о. Зміїний); 5-7 – з локації F (Тилігульський лиман); 8 – вид *M. trossulus*, 9 – вид *M. edulis*, 10 – міжвидовий гібрид *M. trossulus* × *M. edulis* з локації G (референтні зразки мідій з Балтійського моря).

Всі досліджувані особини мідій з локацій (А, В, С, D, E, F) Чорного моря характеризувалися алелями розміром 126 п.н., що свідчить про наявність в досліджених локаціях лише особин виду *M. galloprovincialis* (рис. 3.1).

Серед досліджених особин мідій Чорного моря були зразки – з локації А (дев'ять) та локації В (шість), які за морфологічними ознаками с.н.с., к.б.н. С. В. Стадніченко (ДУ «Інститут морської біології НАН України», м. Одеса) (персональне повідомлення) розглядалися як можливі представники типу *trossulus*-подібні. Однак за результатами молекулярно-генетичного аналізу за допомогою діагностичного маркеру *Me 15-16* всі досліджені особини мідій з Чорного моря визначені як *M. galloprovincialis*.

Namer зі співавторами (Namer et al., 2013) повідомили, що маркер *Me 15-16* використовували для молекулярно-генетичного аналізу популяції мідій Адріатичного моря, які за морфологічними характеристиками визначалися як вид *M. galloprovincialis*, але ПЛР-аналіз показав, що серед 110 проаналізованих особин мідій з 22 локацій Адріатичного моря були присутні дві особини із гетерозиготним генотипом. Одна із особин характеризувалась алелями довжиною 126 п.н. та 180 п.н. і визначалась як гібрид *M. galloprovincialis* × *M. edulis*, друга – 126 п.н. та 168 п.н. і визначалась як гібрид *M. galloprovincialis* × *M. trossulus*, отримані результати були підтвердженні секвенуванням продуктів ПЛР.

3.2. Визначення видової приналежності мідій Балтійського, Північного та Ватового морів за результатами молекулярно-генетичного аналізу

За допомогою молекулярного маркера *Me 15-16* було також проаналізовано 38 особин мідії виловлених у Балтійському морі (локація G), 20 особин мідій – у Північному морі (локація H) та 14 особин – у Ватовому морі (локація J).

Згідно результатів молекулярно-генетичного аналізу, серед особин мідій з Балтійського моря було детектовано: одну особину виду *M. trossulus* – характеризувалася фрагментом ампліфікації 168 п.н., 26 особин виду *M. edulis* – для

них виявлено фрагмент ампліфікації 180 п.н. та 11 гібридів *M. trossulus* × *M. edulis* – спектр ампліфікації відповідає гетерозиготному генотипу (рис. 3.2).

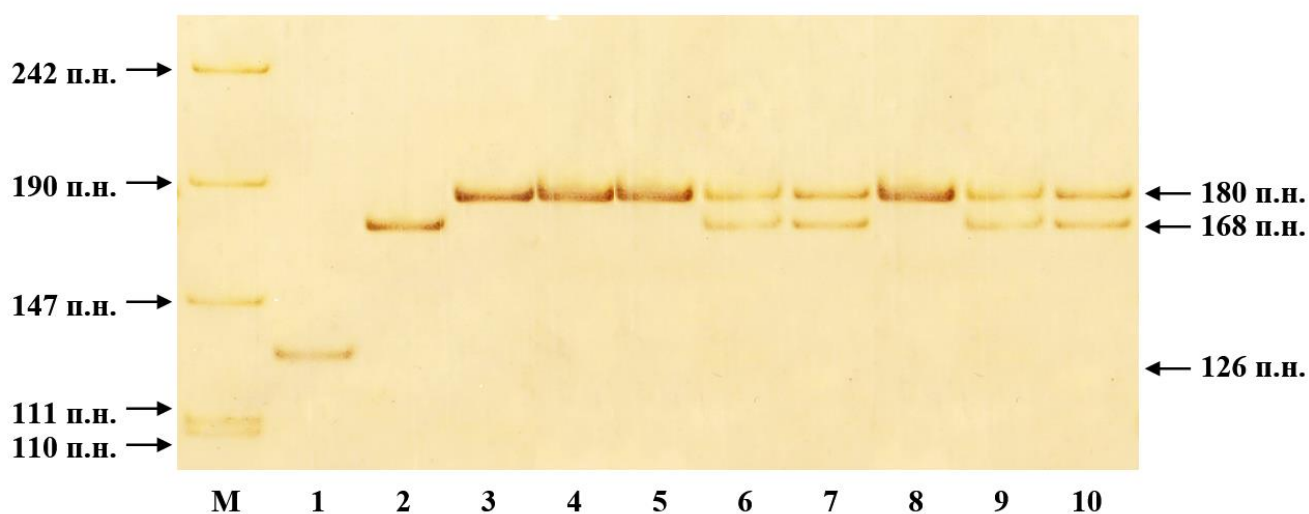


Рис. 3.2. Електрофореграма розподілення у 7% ПААГ продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР із застосуванням праймерів *Me 15 / Me 16* й ДНК мідій з Балтійського моря: М – маркер *pUC 19 / Msp I*; 1 – контрольний зразок з Чорного моря (*M. galloprovincialis*); 2 – вид *M. trossulus*; 3-5, 8 – вид *M. edulis*; 6, 7, 9, 10 – міжвидові гібриди *M. trossulus* × *M. edulis*.

Відомо (Knöbel et al., 2021), що в Балтійському морі зустрічаються два види *Mytilus*: *M. edulis* і *M. trossulus*. Вид *M. edulis* колонізує Західну частину Балтійського моря при солоності від 12 до 25‰, а *M. trossulus* зустрічається в Східній Балтиці при солоності від 4,5 до 8‰. При цьому *M. edulis* і *M. trossulus* демонструють місцеву адаптацію до природної солоності, утворюючи зони гібридизації.

За результатами генотипування особин мідії з Північного моря нами було виявлено 19 гомозиготних і один гетерозиготний генотип. Серед гомозиготних організмів для 18 особин виявлено фрагмент ампліфікації 180 п.н., що відповідає алелю, який характеризує вид *M. edulis*, і для однієї особини фрагмент ампліфікації 126 п.н., що відповідає алелю виду *M. galloprovincialis*. Виявлений гетерозиготний

організм характеризувався алелями – 126 п.н. і 180 п.н., та був ідентифікований як гібрид *M. galloprovincialis* × *M. edulis* (рис. 3.3).

За даним молекулярно-генетичного аналізу серед особин мідій з Ватового моря детектовано 13 особин виду *M. edulis*, які характеризувалися фрагментом ампліфікації 180 п.н. та одного гібрида *M. galloprovincialis* × *M. edulis*, який характеризувався фрагментом ампліфікації 126 п.н. та 180 п.н. (рис. 3.4).

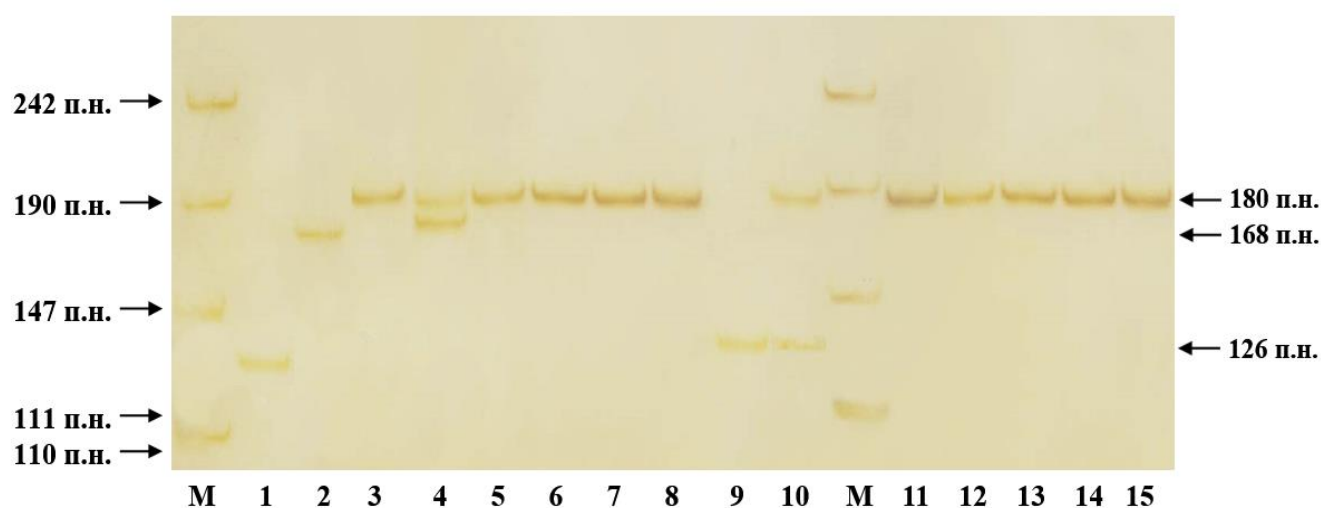


Рис. 3.3. Електрофореграма розподілу в 7% поліакриламідному гелі фрагментів ампліфікації, отриманих у ПЛР з використанням праймерів *Me 15 / Me 16* та ДНК мідій з Північного моря, на треках: М – маркер *pUC 19 / Msp I*; 1 – контрольний зразок з Чорного моря (*M. galloprovincialis*); 2-4 – контрольні зразки з Балтійського моря (*M. trossulus*, *M. edulis*, *M. trossulus* × *M. edulis*); 5-8 – *M. edulis*; 9 – *M. galloprovincialis*; 10 – *M. edulis* × *M. galloprovincialis*; 11-15 – *M. edulis*.

За даним молекулярно-генетичного аналізу серед особин мідій з Ватового моря детектовано 13 особин виду *M. edulis*, які характеризувалися фрагментом ампліфікації 180 п.н. та одного гібрида *M. galloprovincialis* × *M. edulis*, який характеризувався фрагментом ампліфікації 126 п.н. та 180 п.н. (рис. 3.4).

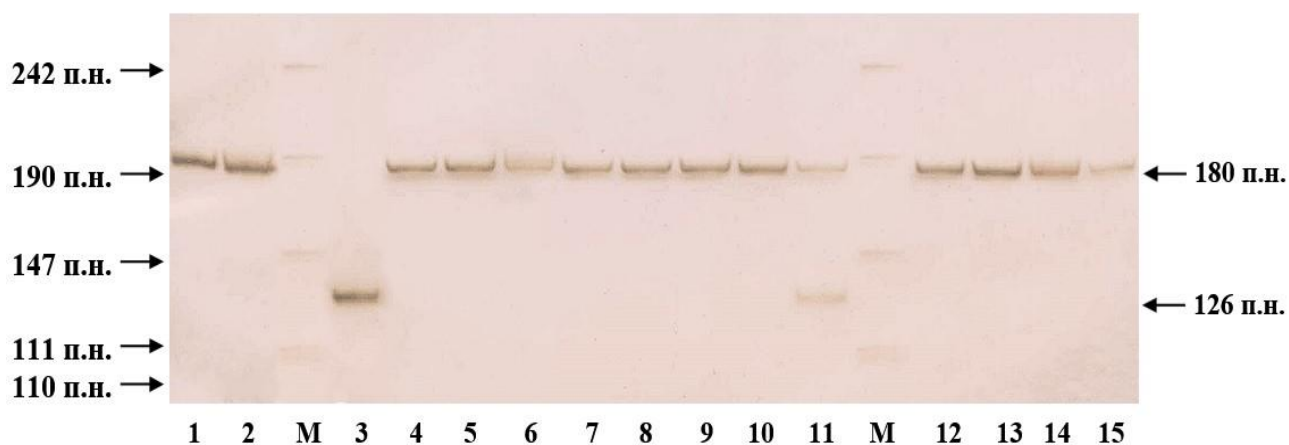


Рис. 3.4. Електрофореграма розподілення у 7% ПААГ продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР із застосуванням праймерів *Me 15 / Me 16* й ДНК мідій з Ватового моря: М – маркер *pUC 19 / Msp I*; 1, 2, 4-10, 12-15– вид *M. edulis*; 3 – контрольний зразок з Чорного моря (*M. galloprovincialis*); 11 – міжвидовий гібриди *M. galloprovincialis* × *M. edulis*.

Отримані результати проведеного нами молекулярно-генетичного аналізу узгоджуються з даними літератури (Michalek et al., 2016; Boukadida et al., 2021). В якій повідомляється, що в Європі види *M. edulis* і *M. galloprovincialis* гібридизуються вздовж узбережжя Атлантичного океану, створюючи ділянки як чистих, так і гібридних популяцій. У той же час, гібридну зону *M. edulis* × *M. trossulus* можна знайти в Балтійському морі.

Визначені мідії з Балтійського, Північного та Ватового морів використовували в роботі для філогенетичного та мікросателітного аналізів в якості зовнішньої групи.

3.3. Генетична характеристика угруповань мідій за допомогою *Me 15-16*

Згідно результатів молекулярно-генетичного аналізу з використанням молекулярного маркера *Me 15-16* всі особини мідій з 6 локацій (А, В, С, D, Е, F) Чорного моря були ідентифіковані як вид *M. galloprovincialis* (171 особина). Серед мідій з Балтійського моря були виявлені представники видів *M. trossulus* (одна

особина), *M. edulis* (26 особин) та їхні гібриди (11 особин). У вибірці мідій з Північного моря було виявлено *M. edulis* (18 особин), *M. galloprovincialis* (одна особина) та їхній гібрид. Серед особин мідій з Ватового моря виявлено *M. edulis* (13 особин) та одного гібрида *M. galloprovincialis* × *M. edulis*.

Загалом було детектовано три алеля (126 п.н., 168 п.н., 180 п.н.) та п'ять генотипів (126–126 п.н, 126–180 п.н., 168–168 п.н, 168–180 п.н., 180–180 п.н.). На основі отриманих результатів було розраховано частоти алелів і генотипів для досліджуваних угруповань мідій (табл. 3.1).

Гомозиготні особини виду *M. edulis* визначені за маркерним геном *Fp1* адгезивного білка ноги мідій, що детектували за допомогою молекулярного маркера *Me 15-16*, переважно поширені в досліджуваних локаціях: Балтійського моря (біля м. Росток, за географічними координатами 54°10'55" пн. ш. і 12°5'18" пд. ш., частота зустрічальності особин виду *M. edulis* 0,684), Північного моря (біля бельгійського узбережжя – 51°8'23" пн. ш. і 2°39'58" пд. ш., частота – 0,900) та Ватового моря (біля німецького узбережжя – 53°41'12" пн. ш. і 7°21'27" пд. ш., частота – 0,929).

Біля м. Росток у Бельгійському морі достатньо помітні наслідки міжвидової гібридизації між *M. edulis* і *M. trossulus* (частота зустрічальності гібридів 0,289). У Північному і Ватовому морях в досліджуваних локаціях Н і J з незначною частотою зустрічаються гібриди *M. edulis* з *M. galloprovincialis*.

**Частоти алелів і генотипів, що визначені за допомогою ПЛР з маркером *Me 15-16*
у досліджених мідій з різних акваторій**

Морські води	<i>n</i>	Алелі			Генотипи				
		Mg	Mt	Me	Mg/Mg	Mg/Me	Mt/Mt	Mt/Me	Me/Me
		126	168	180	126 – 126	126 – 180	168 – 168	168 – 180	180 – 180
Чорне море	171	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Балтійське море	38	0,000	0,171	0,829	0,000	0,000	0,026	0,289	0,684
Північне море	20	0,075	0,000	0,925	0,050	0,050	0,000	0,000	0,900
Ватове море	14	0,036	0,000	0,964	0,000	0,071	0,000	0,000	0,929

Примітка. *n* – розмір вибірки (кількість особин). Жирним шрифтом в таблиці відмічено частоти алелів та генотипів, які зустрічаються найчастіше в досліджуваних морських водах.

Алелі та генотипи позначено скорочено, у відповідності із визначеними фрагментами ПЛР, детектованими у різних видів мідій, за використання діагностичного маркеру *Me 15-16*:

- *M. galloprovincialis* – Mg, 126 п.н.;
- *M. trossulus* – Mt, 168 п.н.;
- *M. edulis* – Me, 180 п.н.

РОЗДІЛ 4. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ АДГЕЗИВНОГО БІЛКА МІДІЙ РОДУ *MYTILUS*

4.1. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка представників роду *Mytilus*

Для зрозуміння спостерігаємої генетичної варіабельності за нуклеотидними послідовностями гена *Fp1* адгезивного білка у представників різних видів роду *Mytilus* й, за можливістю, розширення меж застосування маркера *Me 15-16* для визначення видової приналежності мідій, було проведено порівняльний аналіз повних і часткових нуклеотидних послідовностей, «варіабельної області» генів адгезивного білка мідій знайдених в базі даних GenBank, приклад наведено на рис. 4.1.

Показана на рис. 4.1 досліджувана область, яка обмежується парою праймерів *Me 15 / Me 16*, відрізняється у різних видів мідій наявністю делецій та одонуклеотидних поліморфізмів (SNP), і в літературі (Inoue et al., 1995) називається «варіабельною областю».

Під час мультиплексного вирівнювання 21 нуклеотидної послідовності, що відповідала нуклеотидним послідовностям гена адгезивного білка мідій і була завантажена з GenBank (NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), а саме у «варіабельній області» виявлено наявність трьох делецій. Перша делеція була розміром 54 п. н. і зустрічалася в послідовностях *M. galloprovincialis* та *M. chilensis*. Друга делеція була розміром 6 п. н. і зустрічалася у виду *M. trossulus*. Третя делеція мала два розміри – 12 п. н. і 18 п. н., і зустрічалася в послідовностях чотирьох видів мідій: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*. Ця ж делеція мала більший розмір 18 п. н. і була характерна тільки для *M. trossulus*. У нуклеотидних послідовностях видів *M. californianus*, *M. coruscus* в досліджуваній області наявність делецій відсутня.

Серед досліджених нуклеотидних послідовностей «варіабельної області» представлених в базі даних GenBank для *M. galloprovincialis*, у двох з них –

HQ257459 і HQ257468 з Нової Зеландії, зустрічається SNP. Такий же SNP (заміна нуклеотиду гуанін на тимін) в одному і тому самому локусі характерний для *M. chilensis* (рис. 4.1). Шість послідовностей *M. edulis* характеризувалися наявністю однакових SNP (заміна нуклеотиду тимін на аденін). Також, зустрічається ще по одному SNP в послідовностях AY845258 і KY549936, які є не характерними для інших послідовностей *M. edulis*. Дві короткі послідовності *M. trossulus* характеризувалися наявністю SNP, частина з яких була наявна також в послідовностях *M. californianus* і *M. coruscus* (рис. 4.1). У видів *M. californianus* та *M. coruscus* послідовність, яка відповідає праймерам *Me 15* / *Me 16*, характеризується наявністю SNP. Тому, дані праймери не підходять для ідентифікації зазначених видів мідій. «Варіабельна область» видів *M. californianus* та *M. coruscus* значною мірою відрізняється від інших видів мідій за рядом SNP.

```

HQ257469.1-M.gallopvncialis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
AF489933.1-Mytilus sp. ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
D63778.1-M.gallopvncialis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
KY549937.1-M.gallopvncialis ---gtatacaaacctgtgaagacaagt-----
HQ257459.1-M.gallopvncialis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
KY549938.1-M.gallopvncialis ---gtatacaaacctgtgaagacaagt-----
HQ257470.1-M.gallopvncialis cctgtatgcaaacctgtgaagacaagt-----
HQ257468.1-M.gallopvncialis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
DQ640590.1-M.gallopvncialis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
DQ640601.1-M.chilensis ccagtatacaaacctgtgaagacaagt-----
KY549934.1-M.edulis ---gtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
AY845258.1-M.edulis ccagtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
KY549936.1-M.edulis ---gtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
X54422.1-M.edulis ccagtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
DQ640586.1-M.edulis -----caagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
DQ640587.1-M.edulis -----caagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
KY549940.1-M.trossulus ---gtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
AY960602.1-M.californianus ccagtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
AY960601.1-M.californianus ccagtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
D63777.1-M.coruscus ccagtatacaaacctgtgaagacaagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac
D50553.1-M.trossulus -----caagttattcggccacatataaacaccacaacataccaaccac

HQ257469.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
AF489933.1-Mytilus sp. -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
D63778.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
KY549937.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
HQ257459.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
KY549938.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
HQ257470.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
HQ257468.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
DQ640590.1-M.gallopvncialis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
DQ640601.1-M.chilensis -----tatcatcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
KY549934.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
AY845258.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
KY549936.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
X54422.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
DQ640586.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
DQ640587.1-M.edulis tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
KY549940.1-M.trossulus tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
AY960602.1-M.californianus cctataaaaccgaaaggtatcctcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
AY960601.1-M.californianus cctataaaaccgaaaggtatcctcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
D63777.1-M.coruscus cctataaaaccgaaaggtatcctcctacgaatagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa
D50553.1-M.trossulus tcaaaaagaaagtgactatcgtcctacgaaagttatccgccaacatattggatcaaagacaaa

HQ257469.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
AF489933.1-Mytilus sp. ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
D63778.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
KY549937.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
HQ257459.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
KY549938.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
HQ257470.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
HQ257468.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
DQ640590.1-M.gallopvncialis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtca-----
DQ640601.1-M.chilensis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtca-----
KY549934.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
AY845258.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
KY549936.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
X54422.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
DQ640586.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtca-----
DQ640587.1-M.edulis ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtca-----
KY549940.1-M.trossulus ctatct-----gccacttgcaaaagaagctgtcacttacaacacctattaagacaaca
AY960602.1-M.californianus ctatccgccaatataaagccaagttgcaaaagaagctatcctacatacaaaagctattaagacaacg
AY960601.1-M.californianus ctatccgccaatataaagccaagttgcaaaagaagctatcctacatacaaaagctattaagacaacg
D63777.1-M.coruscus ctatccgccaatataaagccaagttgcaaaagaagctatcctacatacaaaagctattaagacaacg
D50553.1-M.trossulus ctatct-----tgcaaaagaagctgtca-----

```

Рис. 4.1. Фрагмент мультиплексного вирівнювання нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка представників роду *Mytilus*, здійснене за алгоритмом MAFFT. Кольором позначено: послідовності праймерів *Me 15 / Me 16* до гену адгезивного білка ноги мідії – жовтий; SNP в праймерах *Me 15 / Me 16* – голубий; SNP в гені адгезивного білка різних видів мідій, що фланкується парою праймерів *Me 15 / Me 16* – зелений.

Використовуючи обрану з GenBank 21 нуклеотидну послідовність, у програмі MEGA було побудовано дендрограму, що представлена на рис. 4.2. Порівняння нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка ноги двостулкових молюсків дозволило побудувати дендрограму, яка відображає філогенетичні відношення видів мідій в роді *Mytilus*.

Отримана дендрограма розділилася на два кластери – один більший кластер, складала послідовності видів: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*; до другого увійшли – *M. californianus* та *M. coruscus*. У склад більшого кластеру входять два субкластери, відокремлюючи *M. galloprovincialis* і *M. chilensis* від *M. edulis* і *M. trossulus*. Перший субкластер (розташований у верхній частині дендрограми) містить послідовності *M. galloprovincialis* з Туреччини, Чилі. Послідовності *M. galloprovincialis* з двох ізолятів із Нової Зеландії проявляли подібність до послідовності *M. chilensis*, але все ж групувалися з іншими послідовностями *M. galloprovincialis*. Другий субкластер налічував послідовності з різних ізолятів *M. edulis*, до яких окремою гілкою приєднувалися дві дуже подібні між собою послідовності *M. trossulus*. Окремий кластер на дендрограмі сформований послідовностями *M. californianus* і *M. coruscus*.

Отриманий розподіл досліджуваних видів мідій за допомогою кластерного аналізу узгоджується із даними літератури щодо географічного поширення цих видів, які демонструють широтне роз'єднане антитропічне розповсюдження (тобто види зустрічаються по обидві сторони тропічної зони, але не всередині неї): *M. trossulus*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus* та *M. coruscus* зустрічаються в Північній півкулі; інтродукований вид *M. galloprovincialis* і *M. chilensis* – в Південній півкулі (Gaitán-Espitia et al., 2016). На основі варіації послідовності мітохондріального гену *COI*, за даними філогенетичного аналізу, також було виявлено більшу подібність між *M. californianus* і *M. coruscus*, та серед трьох видів: *M. galloprovincialis*, *M. edulis* та *M. trossulus* (Oyarzún et al., 2021).



Рис. 4.2. Дендрограма, побудована методом незалежного парногрупового кластерного аналізу UPGMA на основі генетичних дистанцій між нуклеотидними послідовностями адгезивного білка мідій роду *Mytilus*. Числа на схемі – бутстреп індекс.

4.2. Аналіз структури адгезивного білка *Mytilus galloprovincialis*

Мідії здатні виробляти клейкоподібний матеріал, відомий як бісус, утворений білками ноги мідії (Mussel foot proteins, Mfps). Бісус складається, в основному, з чотирьох частин, а саме: бляшки, нитки, стебла та кореня. Окремі нитки проксимально зливаються разом, утворюючи стебло та основу стебла (кореня), глибоко закріпленого в основі ноги молюска. Кожна бісусна нитка закінчується дистально сплющеним нальотом, який опосередковує адгезію до субстрату (Harper et al., 2000; Hennebert et al., 2015; Forooshani, Lee, 2016; DeMartini et al., 2017). Кожна частина комплексу бісусних ниток утворюється в результаті самоскладання секреторних продуктів, що походять з чотирьох окремих залоз, укладених у ніжку мідії (Hennebert et al., 2015; Maier et al., 2015).

Адгезивні білки ноги мідій (Mfps) мають здатність зв'язувати різноманітний субстрат за допомогою адгезивних бляшок. Основним компонентом в Mfps є 3,4-дигідроксифенілаланін (ДОФА), який утворюється в результаті посттрансляційного гідроксилювання тирозину. Під час цієї посттрансляційної модифікації, поліфенолоксидази каталізують о-гідроксилювання монофенолів (тироzinу) до о-дифенолів (ДОФА). Кількість ДОФА впливає на адгезивну здатність Mfps (Zhao, Waite, 2006; Yu et al., 2011; Maier et al., 2015; Forooshani, Lee, 2016).

За даними літератури відомо (Bandara et al., 2013), що адгезивний наліт містить щонайменше шість окремих білків: Mefp-1, Mefp-2, Mefp-3, Mefp-4, Mefp-5, Mefp-6. Перші п'ять були виділені з *M. edulis* та характерні і для інших представників мідій: *M. californicus*, *M. galloprovincialis* та *M. coruscus*. В той же час Mefp-6 виділений тільки з *M. californicus* (Zhao, Waite, 2006; Bandara et al., 2013).

Для проведення біоінформатичного аналізу на сервері UniProt було знайдено повну амінокислотну послідовність адгезивного білка ноги Mefp-1 для виду *M. galloprovincialis* довжиною 751 амінокислота (Q27409), який кодується геном *Fp1*. Для даної послідовності за допомогою програмного інструменту ProtParam,

розміщеного на сервері ExPASy, було розраховано молекулярну масу білка – 85,791 Да та показано значне переважання в амінокислотній послідовності проліну (24,1%), лізину (19,2%) і тирозину (19%), а також серину (12%) і треоніну (10,4%).

З використанням сервера I-TASSER була спрогнозована вторинна структура адгезивного білка *M. galloprovincialis* (Q27409). Слід зазначити, що I-TASSER було запропоновано п'ять моделей просторової структури адгезивного білка *M. galloprovincialis*. Приклад найбільш ймовірної тривимірної моделі даного білка представлено на рис. 4.3.

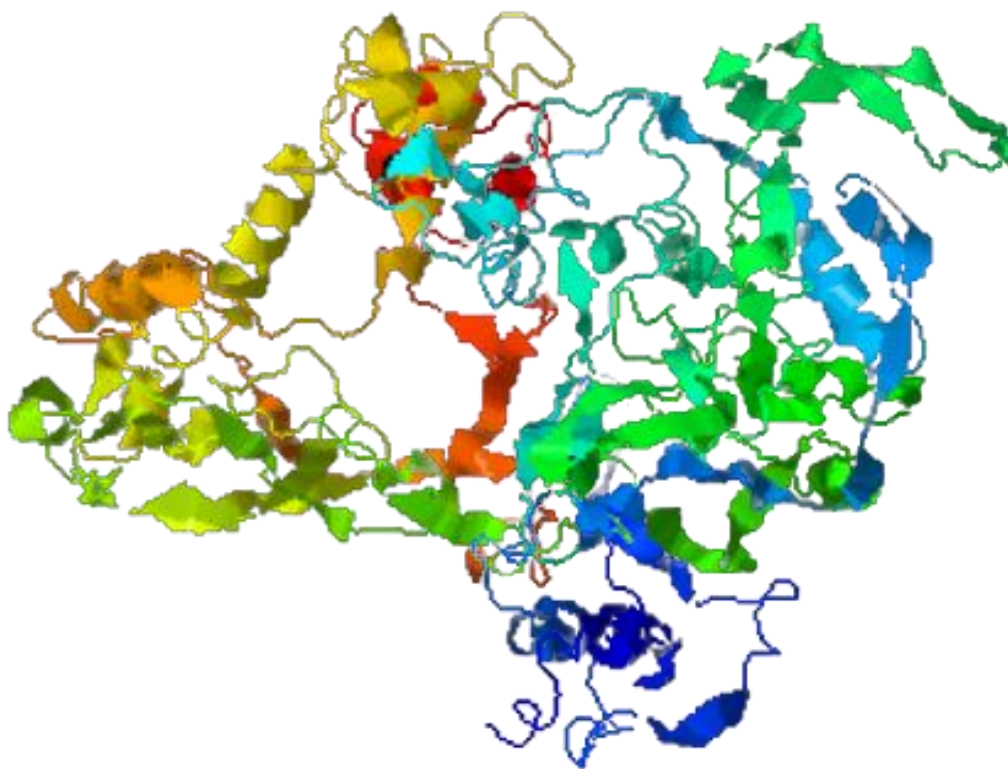


Рис. 4.3. Тривимірна модель адгезивного білка *Mytilus galloprovincialis*, отримана за допомогою сервера I-TASSER.

В отриманій моделі адгезивного білка *M. galloprovincialis* присутні ділянки зі структурою α -спіралі і β -складчатою структурою, також виявлено неструктуровані ділянки. Для оцінки якості прогнозованих моделей I-TASSER використовують C-показник, який розраховується на основі значущості вирівнювання послідовності запиту відносно послідовності шаблону та параметрів конвергенції структури

моделювання складання (Yang, Zhang, 2015). Загалом, моделі з C-показником $> -1,5$ мають правильну складку. Отримані нами значення C-показника $(-0,70)$, TM-оцінки $(0,62 \pm 0,14)$, RMSD $(9,9 \pm 4,6)$ та щільності кластера $(0,2897)$ для представленої моделі адгезивного білка *M. galloprovincialis* вказують на модель правильної глобальної топології.

Побудована модель структури адгезивного білка *M. galloprovincialis* за допомогою серверу I-TASSER характеризувалася більшою достовірністю порівняно з моделлю спрогнозованою програмою AlphaFold. Просторова структура адгезивного білка *M. galloprovincialis* спрогнозована програмою AlphaFold характеризувалася низькими показниками достовірності, що на певних ділянках знаходилися в межах $50 < pLDDT < 70$ або навіть нижче. В зв'язку з цим, ми надали перевагу моделі, спрогнозованій сервером I-TASSER.

Моделювання в даний час є одним з передових методів біоінформатики. Отримані результати біоінформатичного аналізу розширюють знання про первинну й вторинну структуру адгезивного білка *M. galloprovincialis*. А кластерний аналіз, проведений на основі порівняння нуклеотидних послідовностей генів адгезивного білка, підтверджує ефективність використання для генетичної ідентифікації видів мідій молекулярного маркеру *Me 15-16*, який розташований в межах гена, що кодує адгезивний білок (Inoue et al., 1995). Молекулярний маркер *Me 15-16* відповідає менделівській моделі успадкування, дозволяє визначати гетерозиготні особини, що утворилися за результатом міжвидової гібридизації і є найпоширеним діагностичним маркером для ідентифікації видів мідій на основі ДНК (Larraín et al., 2019).

Відповідно до результатів пошуку в базах даних Science Direct і Web of Science для дослідження з використанням будь-якого аналізу ДНК для ідентифікації видів *Mytilus*, опублікованих з 1995 року до сьогодні, $\sim 80\%$ досліджень використовували маркер, націлений на ген адгезивного білка (Larraín et al., 2019).

РОЗДІЛ 5. МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ТА СТРУКТУРИ ПОПУЛЯЦІЇ МІДІЙ

5.1. Алельна характеристика мідій за мікросателітними локусами

На даний момент для вивчення структури популяції та генетичного різноманіття багатьох видів аквакультури широко використовується молекулярний аналіз (Liu, Cordes, 2004). Було показано (Sun et al., 2008), що мікросателітні (МС) маркери є придатними інструментами для оцінки генетичного різноманіття завдяки їх генетичним характеристикам, включаючи високий рівень поліморфізму, специфічність та кодомінантне успадкування. МС широко використовуються для моніторингу генетичної варіації вирощуваних тварин, визначення батьківства та досліджень структури популяції (Geist, Kuehn, 2005; Zhan et al., 2009; Gao et al., 2010), а також для порівняння генетичного різноманіття між дикими та культивованими популяціями морських видів мідій (Giantsis et al., 2014; Larraín et al., 2015; Hamilton et al., 2023).

За результатами мікросателітного аналізу з використанням чотирьох МС-локусів (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було визначено 64 алельних варіантів у 9 досліджуваних вибірках мідій ($n = 188$). Для шести локацій ($n = 119$) з ПЗЧМ за досліджуваними локусами визначено 52 алеля: у локації А ($n = 26$) – 34 алеля, локації В ($n = 19$) – 23 алеля, локації С ($n = 18$) – 22 алеля, локації D ($n = 16$) – 27 алелів, локації Е ($n = 17$) – 29 алелів, локації F ($n = 23$) – 25 алелів. Для локації G ($n = 37$) з Балтійського моря визначено 39 алелів, локації H ($n = 18$) з Північного моря – 35 алелів, локації J ($n = 14$) з Ватового моря – 27 алелів. Серед визначених алелів МС-локусів, які відрізнялися за частотами, були присутні як спільні алелі для всіх досліджуваних угруповань мідій, так і алелі, характерні тільки для зразків з окремих угруповань мідій (табл. 5.1).

В таблиці 5.1 не представлено частоти алелів за МС-локусом *Mch 5* для особин мідій з локації Е (Одеська затока, Чорне море) через малу кількість зразків ($n = 3$), які було отримано в результаті ПЛР. Проте, було розраховано частоти алелів для інших трьох МС-локусів (*Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) і описано в тексті.

Частоти алелів мікросателітних локусів і розмір вибірки за досліджуваними угрупованнями мідій

Локус	Розмір алеля в п.н.	Частоти алелів у локації							
		A	B	C	D	F	G	H	J
<i>Mch 5</i>	$N_A = 13$	$n = 24$	$n = 14$	$n = 11$	$n = 10$	$n = 9$	$n = 25$	$n = 14$	$n = 14$
	229	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000	0,060	0,000	0,000
	233	0,000	0,143	0,000	0,100	0,222	0,060	0,000	0,036
	237	0,271	0,214	0,136	0,250	0,278	0,180	0,000	0,036
	239	0,021	0,286	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,071
	241	0,646	0,357	0,682	0,550	0,333	0,120	0,143	0,179
	243	0,042	0,000	0,091	0,100	0,167	0,000	0,429	0,429
	245	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,340	0,107	0,143
	249	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,071	0,000
	253	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
	257	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,107
	261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
	265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,107	0,000
	287	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000

Продовження табл. 5.1

<i>Mch 8</i>	$N_A = 17$	$n = 26$	$n = 15$	$n = 12$	$n = 13$	$n = 19$	$n = 28$	$n = 16$	$n = 14$
	185	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000
	193	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000
	195	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000
	197	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,089	0,000	0,000
	203	0,000	0,000	0,000	0,115	0,105	0,161	0,000	0,000
	207	0,000	0,033	0,042	0,308	0,000	0,000	0,000	0,000
	209	0,154	0,133	0,167	0,269	0,000	0,018	0,063	0,000
	211	0,000	0,000	0,000	0,038	0,026	0,018	0,000	0,000
	213	0,385	0,600	0,792	0,154	0,368	0,000	0,188	0,179
	215	0,096	0,033	0,000	0,000	0,289	0,089	0,188	0,143
	217	0,269	0,200	0,000	0,000	0,000	0,036	0,031	0,000
	223	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,286	0,156	0,357
	225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,089	0,156	0,000
	227	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,089	0,000	0,000
	229	0,058	0,000	0,000	0,000	0,211	0,089	0,031	0,286
	237	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,156	0,036
245	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Продовження табл. 5.1

<i>MT 203</i>	$N_A = 17$	$n = 25$	$n = 12$	$n = 8$	$n = 15$	$n = 22$	$n = 34$	$n = 17$	$n = 14$
	167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071
	175	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,029	0,000	0,107
	179	0,080	0,083	0,063	0,133	0,159	0,426	0,206	0,071
	181	0,080	0,167	0,000	0,167	0,182	0,059	0,059	0,000
	183	0,040	0,000	0,125	0,267	0,023	0,059	0,000	0,214
	185	0,280	0,167	0,125	0,067	0,250	0,132	0,147	0,000
	187	0,160	0,125	0,375	0,067	0,182	0,088	0,059	0,179
	189	0,100	0,292	0,063	0,067	0,045	0,044	0,324	0,000
	191	0,060	0,125	0,188	0,033	0,091	0,074	0,059	0,107
	195	0,080	0,000	0,000	0,133	0,000	0,059	0,029	0,000
	203	0,040	0,000	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000	0,071
	211	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,015	0,000	0,071
	215	0,020	0,042	0,063	0,000	0,000	0,015	0,088	0,107
	217	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000
	229	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	237	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
243	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Продовження табл. 5.1

MT 282	$N_A = 13$	$n = 22$	$n = 16$	$n = 13$	$n = 13$	$n = 19$	$n = 31$	$n = 17$	$n = 14$
	332	0,295	0,125	0,038	0,038	0,000	0,000	0,059	0,000
	334	0,273	0,531	0,192	0,115	0,553	0,371	0,118	0,393
	336	0,091	0,031	0,192	0,154	0,026	0,194	0,000	0,071
	338	0,023	0,156	0,154	0,000	0,079	0,081	0,176	0,143
	340	0,045	0,000	0,192	0,385	0,105	0,048	0,147	0,000
	342	0,068	0,000	0,038	0,000	0,053	0,097	0,000	0,000
	344	0,091	0,063	0,038	0,154	0,132	0,161	0,294	0,071
	348	0,068	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	350	0,023	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,088	0,214
	354	0,000	0,031	0,000	0,115	0,053	0,048	0,029	0,107
	364	0,023	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000
	368	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,000
372	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	

Примітка. n – розмір вибірки (кількість особин); N_A – кількість алелів; жирним шрифтом в таблиці відмічено частоти алелів, які зустрічаються найчастіше в досліджуваних локаціях (А – Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В – район Меморіалу 411-ї батареї; С – о. Зміїний; D – Сухий лиман; F – Тилігульський лиман; G – Балтійське море; H – Північне море; J – Ватове море).

За МС-локусом *Mch 5* було визначено 14 алелів, розміри алелів варіювали від 223 п.н. до 287 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі з розміром фрагментів ампліфікації 241 п.н. у локаціях А (0,646), В (0,357), С (0,682), D (0,550), F (0,333); 243 п.н. у локації Н і J – з частотою 0,429; 245 п.н. у локації G – 0,340. За МС-локусом *Mch 8* – 20 алелів, розміри яких варіювали від 185 п.н. до 245 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі – 207 п.н. у локаціях D (0,308) і E (0,176); 213 п.н. з різною частотою у локаціях А (0,385), В (0,600), С (0,792), F (0,368), G (0,188); 215 п.н. – у локації G з частотою 0,188; 223 п.н. – у локації Н (0,286) і J (0,357). За МС-локусом *MT 203* – 17 алелів, розміри яких варіювали від 167 п.н. до 243 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі – 179 п.н. у локації G з частотою 0,426; 183 п.н. з різною частотою у локаціях D (0,267) і J (0,214); 185 п.н. у локаціях А (0,280), E (0,375) і F (0,250); 187 п.н. у локації С – 0,375; 189 п.н. з різною частотою у локаціях В (0,292) і Н (0,324). За МС-локусом *MT 282* – 13 алелів, розміри яких варіювали від 332 п.н. до 372 п.н. Найчастіше зустрічалися алелі – 332 п.н. у локації А з частотою 0,295; 334 п.н. з різною частотою у локаціях А (0,273), В (0,531), С (0,192), E (0,300), F (0,553), G (0,371); 336 п.н. у локації С – 0,192; 340 п.н. у локаціях С (0,192) і D (0,385); 344 п.н. у локації Н – 0,294.

За допомогою ПЛР-аналізу, з використанням пар праймерів до МС-локусів геному мідій, для досліджуваних угруповань молюсків було детектовано п'ять спільних алелів різних розмірів: 241 п.н. за МС-локусом *Mch 5*; 187 п.н. і 191 п.н. – *MT 203*; 334 п.н. і 344 п.н. – *MT 282*. Для угруповань мідій виловлених із шести локацій (А, В, С, D, E, F) ПЗЧМ було виявлено 9 спільних алелів за досліджуваними МС-локусами: 237 п.н. і 241 п.н. за МС-локусом *Mch 5* (без урахування даних по локації E); 213 п.н. – *Mch 8*; 185 п.н., 187 п.н., 189 п.н. і 191 п.н. – *MT 203*; 334 п.н. і 344 п.н. – *MT 282*. Для угруповань мідій виловлених з інших морів (Балтійського – локація G, Північного – локація Н та Ватового – локація J) виявлено 13 спільних алеля: 241 п.н. і 245 п.н. за МС-локусом *Mch 5*; 215 п.н., 223 п.н. та 229 п.н. – *Mch 8*; 179 п.н., 187 п.н., 191 п.н. та 215 п.н. – *MT 203*; 334 п.н., 338 п.н., 344 п.н. та 354 п.н. – *MT 282*.

Серед досліджуваних угруповань мідій ПЗЧМ було виявлено 8 алелів, яких не виявлено в угрупованнях мідій Балтійського, Північного та Ватового морів, а також 14 інших алелів – спільних для досліджених мідій з усіх морів.

За МС-локусом *Mch 5* мідії з ПЗЧМ відрізнялися від мідій з Балтійського моря наявністю алелів розміром: 223 п.н. (виявлений лише для мідій виловлених з локації Е), 239 п.н., 243 п.н., 257 п.н. та відсутністю алелів – 245 п.н., 249 п.н., 253 п.н., 261 п.н. і 265 п.н. За досліджуванним МС-локусом угруповання мідії з ПЗЧМ відрізнялися від мідій з Північного моря наявністю алелів: 223 п.н., 229 п.н., 233 п.н. та 237 п.н., та відсутністю алелів – 245 п.н., 249 п.н., 265 п.н. і 287 п.н. Від мідій з Ватового моря, угруповання молюсків з ПЗЧМ відрізнялися наявністю двох алелів: 223 п.н. і 229 п.н., та відсутністю алеля розміром 245 п.н.

За МС-локусом *Mch 8* особини мідій з шести локації Чорного моря відрізнялися від особин з трьох локацій інших морів наявністю двох алелів: 207 п.н. і 245 п.н. Чорноморські мідії відрізнялися від мідій з Балтійського моря відсутністю в них алелів: 185 п.н. і 197 п.н.; від мідій з Північного моря відсутність алеля розміром 193 п.н.

За МС-локусом *MT 203* локації Чорного моря відрізнялися від локацій Балтійського, Північного та Ватового наявністю в досліджуваних вибірках мідій трьох алелів: 229 п.н., 237 п.н. та 243 п.н. А також відрізнялися відсутністю алеля розміром 165 п.н., який був виявлений лише для особин з Ватового моря; 217 п.н. – виявлений лише для особин з Північного моря.

За МС-локусом *MT 282* чорноморські мідії відрізнялися від мідій Балтійського моря тільки наявністю алелів: 332 п.н., 348 п.н., 350 п.н. та 364 п.н.; від мідій Північного моря відрізнялися наявністю алелів: 336 п.н., 342 п.н., 348 п.н. та 364 п.н. і відсутністю алелів – 368 п.н. і 372 п.н.; від мідій Ватового моря відрізнялися тільки наявністю алелів: 332 п.н., 340 п.н., 342 п.н., 348 п.н. та 364 п.н.

Аналіз розподілу частот алелів за мікросателітними локусами виконаний для кожної вибірки – угруповання мідій з певної локації визначив відсутність нормального розподілу частот алелів. В цьому випадку, коли нормальний розподіл

відсутній для порівняння частот алелів мікросателітів в угруповань мідій з різних локацій застосовували U-критерій Манна-Уїтні. Отримані ймовірності для переважної більшості порівнянь частот алелів між вибірками мідій з різних локацій ПЗЧМ не дали нам підстав говорити про статистично значимі на рівні $p \leq 0,05$ відмінності за частотами алелів МС-локусів між мідіями з різних локацій Чорного моря. Проаналізовані дані свідчили на користь наявності однієї популяції мідій в ПЗЧМ. В той же час, ми спостерігали статистично значимі на рівні $p \leq 0,05$ відмінності за частотами алелів МС між мідіями з локацій ПЗЧМ й Балтійського та Північних морів, а саме: статистично достовірними були різниці за частотами алелів для мідій з локацій В та G за МС-локусом *Mch 5* U-критерій – 4 при $p \leq 0,05$; локацій Е та G за локусом *MT 203* U-критерій – 9 при $p \leq 0,05$; для мідій з локацій В та Н за локусом *Mch 5* U-критерій – 4,5 при $p \leq 0,05$; для мідій з локацій F та Н за локусом *Mch 5* U-критерій – 4 при $p \leq 0,05$; для мідій з локації Е та J за локусом *Mch 8* U-критерій – 10 при $p \leq 0,05$. Мідії з локації G також відрізнялися від мідій з локації J за частотами алелів за локусом *Mch 8* U-критерій – 11 при $p \leq 0,05$.

Виявлені алельні характеристики за МС-локусами геному досліджуваних особин мідій мали як подібні розміри так і виходили за межі діапазону розмірів алелів, що вказані розробниками праймерів (Gardeström et al., 2008; Ouagajjou et al., 2011). Такі розбіжності в зазначених межах розмірів алелів за мікросателітними локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) були продемонстровані при дослідженні популяцій або вибірок різних представників роду *Mytilus* (табл. 5.2). Мідії *M. galloprovincialis* ($n = 12$) з регіону Віго (Іспанія) за локусом *Mch 5* характеризувалися 8 алелями, розмір яких варіював від 205 – 227. За локусом *Mch 8* на вибірці 12 мідій *M. galloprovincialis* визначено 6 алелів, розмір яких зустрічався серед алелей визначених для *M. galloprovincialis* з ПЗЧМ.

З метою визначення рівня генетичного різноманіття досліджуваних угруповань мідій, за кількістю ідентифікованих алелів для кожного з МС-локусів і визначених частот алелів було розраховано основні популяційно-генетичні характеристики (табл. 5.3).

Алельна характеристика досліджуваних мікросателітних локусів, розроблених для роду *Mytilus*

Локус	Вид	Регіони вилову мідій	Розмір алелів в п.п.	N	N_A	H_O	Література
<i>Mch 5</i>	Mch	Регіон Чилое (Кайкаен, Чилі)	213–221	24	4	0,261	Ouagajjou et al. (2011)
	Me	Орхус, Ронде, Данія	221–229	12	3	0,250	
	Mt	Екере, Фінляндія	–	12	–	–	
	Mg	Віго, Іспанія	205–227	12	8	0,545	
	Mch	Регіон Лос-Лагос	215–353	20-53	9	–	Despio (2016)
<i>Mch 8</i>	Mch	Регіон Чилое (Кайкаен, Чилі)	193–207	24	9	0,750	Ouagajjou et al. (2011)
	Me	Орхус, Ронде, Данія	193–211	12	5	0,250	
	Mt	Екере, Фінляндія	184–202	12	3	0,083	
	Mg	Віго, Іспанія	191–203	12	6	0,500	
	Mch	Регіон Лос-Лагос	181–211	20-53	8	–	Despio (2016)
<i>MT 203</i>	Mt	Балтійське море, архіпелаг Борнхольм (Б) і Троза (Т)	161–197	50	Б: 8	0,38	Gardeström et al. (2008)
					Т: 13	0,46	
	Me	Північне море	174–206	16	8	0,56	
	Mg	Нова Зеландія	117–245	16-30	–	0,21-0,60	Westfall (2011)
<i>MT 282</i>	Mt	Балтійське море, архіпелаг Борнхольм (Б) і Троза (Т)	336–354	50	Б: 7	0,25	Gardeström et al. (2008)
					Т: 6	0,18	
	Me	Північне море	336–354	16	9	0,50	
	Mg	Нова Зеландія	324–388	16-30	–	0,40-0,93	Westfall (2011)

Примітка. n – розмір вибірки (кількість особин); N_A – кількість алелів; H_O – спостережувана гетерозиготність. Скорочене позначення виду: *M. galloprovincialis* – Mg; *M. trossulus* – Mt; *M. edulis* – Me; *M. chilensis* – Mch.

Популяційно-генетична характеристика угруповань мідій з різних локацій ПЗЧМ, Балтійського, Північного та Ватового морів за мікросателітними локусами

Назва локації	Локус	n	N_A	Діапазон розмірів алелів у п.н.	N_E	I	H_O	H_E	F
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
А	<i>Mch 5</i>	24	5	237 – 257	2,028	0,930	0,208	0,507	0,589
	<i>Mch 8</i>	26	6	203 – 245	3,874	1,524	0,423	0,742	0,430
	<i>MT 203</i>	25	13	179 – 243	7,062	2,225	0,360	0,858	0,581
	<i>MT 282</i>	22	10	332 – 364	5,232	1,915	0,500	0,809	0,382
В	<i>Mch 5</i>	14	4	233 – 241	3,630	1,334	0,143	0,724	0,803
	<i>Mch 8</i>	15	5	207 – 217	2,381	1,124	0,200	0,580	0,655
	<i>MT 203</i>	12	7	179 – 215	5,538	1,816	0,167	0,819	0,797
	<i>MT 282</i>	16	7	332 – 354	3,012	1,449	0,375	0,668	0,439
С	<i>Mch 5</i>	11	4	229 – 243	2,000	0,969	0,091	0,500	0,818
	<i>Mch 8</i>	12	3	207 – 213	1,524	0,616	0,083	0,344	0,758
	<i>MT 203</i>	8	7	179 – 215	4,571	1,721	0,500	0,781	0,360
	<i>MT 282</i>	13	8	332 – 348	6,145	1,903	0,538	0,837	0,357

Продовження табл. 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	8	10
D	<i>Mch 5</i>	10	4	233 – 261	2,597	1,136	0,300	0,615	0,512
	<i>Mch 8</i>	13	7	203 – 227	4,694	1,701	0,462	0,787	0,414
	<i>MT 203</i>	15	9	175 – 195	6,522	2,024	0,267	0,847	0,685
	<i>MT 282</i>	13	7	332 – 364	4,447	1,692	0,308	0,775	0,603
E	<i>Mch 8</i>	17	14	195 – 237	9,633	2,428	0,529	0,896	0,409
	<i>MT 203</i>	16	5	183 – 191	3,793	1,448	0,063	0,736	0,915
	<i>MT 282</i>	10	8	332 – 364	5,128	1,822	0,500	0,805	0,379
F	<i>Mch 5</i>	9	4	233 – 243	3,767	1,355	0,111	0,735	0,849
	<i>Mch 8</i>	19	5	203 – 229	3,628	1,387	0,158	0,724	0,782
	<i>MT 203</i>	22	9	179 – 211	5,975	1,930	0,182	0,833	0,782
	<i>MT 282</i>	19	7	334 – 354	2,888	1,438	0,842	0,654	-0,288
G	<i>Mch 5</i>	25	9	229 – 265	5,187	1,879	0,200	0,807	0,752
	<i>Mch 8</i>	28	12	185 – 229	6,672	2,137	0,536	0,850	0,370
	<i>MT 203</i>	34	11	175 – 215	4,421	1,903	0,176	0,774	0,772
	<i>MT 282</i>	31	7	334 – 354	4,512	1,702	0,710	0,778	0,088

Продовження табл. 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	<i>Mch 5</i>	14	8	239 – 287	4,170	1,735	0,357	0,760	0,530
	<i>Mch 8</i>	16	9	193 – 237	6,649	1,996	0,375	0,850	0,559
	<i>MT 203</i>	17	9	179 – 217	5,303	1,894	0,353	0,811	0,565
	<i>MT 282</i>	17	9	332 – 372	5,898	1,955	0,294	0,830	0,646
J	<i>Mch 5</i>	14	7	233 – 257	3,920	1,615	0,214	0,745	0,712
	<i>Mch 8</i>	14	5	213 – 237	3,806	1,430	0,429	0,737	0,419
	<i>MT 203</i>	14	9	167 – 215	7,538	2,110	0,786	0,867	0,094
	<i>MT 282</i>	14	6	334 – 354	4,126	1,591	0,214	0,758	0,717

Примітка. n – розмір вибірки (кількість особин); N_A – кількість алелів; N_E – кількість ефективних алелей; I – інформаційний індекс; H_O – спостережувана гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; F – індекс фіксації. Досліджувані локації: А – Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В – район Меморіалу 411-ї батареї; С – о. Зміїний; D – Сухий лиман; Е – Одеська затока (мис «Великий фонтан»); F – Тилігульський лиман; G – Балтійське море; H – Північне море; J – Ватове море.

За даними, наведеними в таблиці 5.3, найбільшу кількість детектованих алелів серед досліджуваних угруповань мідій спостерігали у локації Е (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – 14 алелів, локації А (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *MT 203* – 13 алелів, локації G (Балтійське море) за МС-локусом *Mch 8* – 12 алелів та МС-локусом *MT 203* – 11 алелів. Найменшу кількість детектованих алелів спостерігали у локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – 3 алеля та за МС-локусом *Mch 5* – 4 алеля. За МС-локусом *Mch 5* по 4 алеля також було детектовано у вибірках мідій з трьох локацій (В, D, F) Чорного моря.

Найвище значення ефективної кількості алелів на локус було виявлено у локації Е (Одеська затока, Чорне море) – $N_E = 9,633$; локації J (Ватове море) – $N_E = 7,538$; локації А (Одеська затока, Чорне море) – $N_E = 7,062$. Найменше значення ефективної кількості алелів на локус спостерігали у локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $N_E = 1,524$ та за МС-локусом *Mch 5* – $N_E = 2,000$, а також ще у трьох локаціях Чорного моря: локації А – $N_E = 2,028$; локації В – $N_E = 2,381$; локації D – $N_E = 2,597$. У цьому випадку алелі з низькою частотою мають незначний внесок у ефективну кількість алелів.

Найбільш різноманітними угрупованнями мідій за інформаційним індексом є локація Е (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $I = 2,428$; локація А (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *MT 203* – $I = 2,225$; локація G (Балтійське море) за МС-локусом *Mch 8* – $I = 2,137$; локації J (Ватове море) – $I = 2,110$; локація D (Сухий лиман, Чорне море) за МС-локусом *MT 203* – $I = 2,024$. Найменших значень інформаційний індекс сягає у локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $I = 0,616$, через низький рівень алельного різноманіття.

Найвищі значення спостережувальної гетерозиготності відзначено в локації F (Тилігульський лиман, Чорне море) за МС-локусом *MT 282* – $H_O = 0,842$; локації J (Ватове море) за МС-локусом *MT 203* – $H_O = 0,786$; локації G (Балтійське море) за МС-локусом *MT 282* – $H_O = 0,710$. Найменше значення спостережувальної гетерозиготності відзначено в локації Е (Одеська затока, Чорне море) за МС-

локусом *MT 203* – $H_O = 0,063$ та локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $H_O = 0,083$ і МС-локусом *Mch 5* – $H_O = 0,091$.

Отримані значення очікуваної гетерозиготності були значно вищими спостережуваної гетерозиготності. Найвище значення очікуваної гетерозиготності було виявлено в локація Е (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $H_E = 0,896$ та локації J (Ватове море) за МС-локусом *MT 203* – $H_E = 0,867$. Найменше значення очікуваної гетерозиготності виявлено локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 8* – $H_E = 0,344$.

Індекс фіксації в досліджуваних угрупованнях мідій характеризувався позитивними значеннями, що свідчить про дефіцит гетерозиготних генотипів у досліджуваних угрупованнях мідій. Найвище значення індексу фіксації та дифіцит гетерозигот виявлено в локації Е (Одеська затока, Чорне море) за МС-локусом *MT 282* – $F = 0,915$; локації F (Тилігульський лиман, Чорне море) за МС-локусом *Mch 5* – $F = 0,849$; локації С (о. Зміїний, Чорне море) за МС-локусом *Mch 5* – $F = 0,818$. Незначний надлишок гетерозигот ($F = -0,288$) було відзначено лише в локації F (Тилігульський лиман, Чорне море) за МС-локусом *MT 282*. Можемо припустити, що виявлений дефіцит гетерозигот у досліджуваних молюсків є результатом явища інбридингу або був наявний серед особин мідій нуль алель.

У літературі (Hartl, Clark, 1997) описується, що багато популяцій підрозділяються на групи всередині більших груп, свого роду структуру, яка називається ієрархічною структурою популяції. У великих популяціях географічний поділ популяції дозволяє виділяти субструктури, а види, які поширені на великій географічній території, поділяти на субпопуляції. Субструктури, що виділяють дослідники в популяції є наслідком того, що частоти алелів певних генів або маркерів можуть відрізнятися від однієї субпопуляції до іншої.

За допомогою генетичного коефіцієнту інбридингу субпопуляції відносно всієї загальної популяції (F_{ST}), який використовується для вимірювання генетичної диференціації гена між популяціями щодо частот алеля, було виявлено генетичну

мінливість між угрупованнями мідій з п'яти локацій (А, В, С, D, F) Чорного, Балтійського (локація G), Північного (локація Н) та Ватового (локація J) морів, табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Попарна генетична диференціація серед досліджуваних угруповань мідій з різних локацій, оцінених за мікросателітними локусами

Локації	A	B	C	D	F	G	H	J
A	0,000							
B	0,039	0,000						
C	0,048	0,061	0,000					
D	0,049	0,082	0,075	0,000				
F	0,046	0,041	0,080	0,066	0,000			
G	0,081	0,085	0,127	0,072	0,055	0,000		
H	0,077	0,075	0,109	0,073	0,062	0,054	0,000	
J	0,088	0,084	0,114	0,084	0,054	0,054	0,044	0,000

Примітка. Досліджувані локації тут і в табл. 5.5: А – Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В – район Меморіалу 411-ї батареї; С – о. Зміїний; D – Сухий лиман; F – Тилігульський лиман; G – Балтійське море; H – Північне море; J – Ватове море.

За даними попарної генетичної диференціації за допомогою коефіцієнту F_{ST} , між угрупованням мідій ПЗЧМ встановлено слабку диференціацію, яка варіювала від 0,039 (між локаціями В і А) до 0,049 (між локаціями D і А) та середню, яка варіювала від 0,061 (між локаціями С і В) до 0,082 (між локаціями D і В). Між угрупованнями мідій Чорного, Балтійського, Північного та Ватового морів було встановлено слабку генетичну диференціацію – між локаціями J і H ($F_{ST} = 0,044$); середню, яка варіювала від 0,054 (між локаціями: J і F, J і G, H і G) до 0,127 (між локаціями G і С).

За даними розрахунків генетичних дистанцій за Неєм, отримані значення варіювали від 0,140 до 1,051 (табл. 5.5). Найбільш генетично віддаленими ($D = 1,051$) та найменш подібними ($I = 0,350$) одна від одної виявилися локації С і G. Це свідчить, що локації С і G представлені різними видами мідій і узгоджується з попередніми даними щодо видової приналежності (див. розділ 3). Найменш генетично віддаленими і в той час найбільш подібними були угруповання мідій з локації ПЗЧМ – А і С ($D = 0,140$, $I = 0,869$), А і В ($D = 0,141$, $I = 0,868$), В і F ($D = 0,143$, $I = 0,867$).

Таблиця 5.5

Генетичні дистанції (верхня діагональ) та генетична подібність (нижня діагональ) між угрупованнями мідій за результатами МС-аналізу

Локації	A	B	C	D	F	G	H	J
A	0,000	0,141	0,140	0,287	0,219	0,766	0,651	0,734
B	0,868	0,000	0,195	0,534	0,143	0,737	0,540	0,598
C	0,869	0,823	0,000	0,296	0,307	1,051	0,693	0,653
D	0,750	0,586	0,744	0,000	0,427	0,681	0,670	0,769
F	0,803	0,867	0,736	0,652	0,000	0,413	0,460	0,322
G	0,465	0,479	0,350	0,506	0,661	0,000	0,542	0,456
H	0,522	0,583	0,500	0,511	0,631	0,582	0,000	0,309
J	0,480	0,550	0,521	0,464	0,725	0,634	0,735	0,000

За отриманими даними, представленими у табл. 5.5, угрупованнями мідій з північно-західної частини Чорного моря характеризуються малими генетичними дистанціями, тобто більшою генетичною подібністю, що дозволяє розглядати чорноморських мідій як одну популяцію.

Потрібно зазначити, що виявлені в дослідженні за допомогою мікросателітного аналізу дефіцити гетерозигот та низькі рівні генетичної диференціації раніше були описані в літературі для різних видів мідій: *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) з Нової Зеландії (Wei et al., 2013); *M. edulis* (диких і

вирощених на фермах) з Нью-Гемпшира, США (Daniels, Litvaitis, 2017), *M. galloprovincialis* вздовж східного узбережжя Адріатичного моря (Hamilton et al., 2023).

Загальну оцінку щодо генетичної диференціації досліджуваних угруповань мідій за даними МС-аналізу отримано шляхом проведення філогенетичного аналізу на основі генетичних відстаней встановлених між угрупованнями мідій за розподілом частот алелів МС-локусів (рис. 5.1).

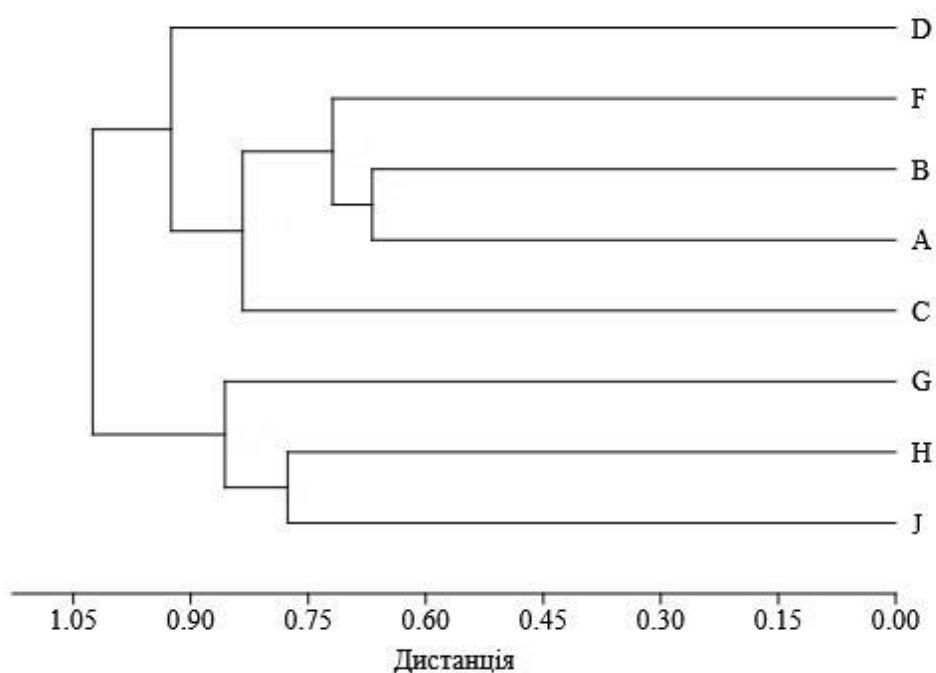


Рис. 5.1. Дендрограма генетичної подібності між угрупованнями мідій з п'яти локацій, побудована на основі генетичних відстаней між ними за розподілом частот алелів МС-локусів (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) з використанням методу UPGMA. Досліджувані локації: А – Одеська затока (Гідробіологічна станція ОНУ); В – район Меморіалу 411-ї батареї; С – о. Зміїний; D – Сухий лиман; F – Тилігульський лиман; G – Балтійське море; H – Північне море; J – Ватове море.

За результатами філогенетичного аналізу досліджувані угруповання мідій утворили два кластери: до першого кластеру увійшли угруповання мідій з ПЗЧМ (локації А, В, С, D, F), до другого кластеру – мідії Балтійського, Північного і Ватового морів (локації G, H, J). Отриманий розподіл локацій на дендрограмі

свідчить про більшу генетичну подібність угруповань мідій Чорного моря і про їх меншу подібність з мідіями, виловленими в Балтійському, Північному та Ватовому морях. Отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо еколого-географічного поширення видів мідій роду *Mytilus* (Gaitán-Espitia et al., 2016; Wenne et al., 2020).

5.2. Генотипова характеристика мідій за мікросателітними локусами

Окрім алельного різноманіття, за чотирма МС-локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було проаналізовано різноманіття генотипів особин мідій з п'яти локацій (А, В, С, D, F) ПЗЧМ, Балтійського (локація G), Північного (локація H) та Ватового (локація J) морів. Загалом, за даними МС-локусами визначено 139 різних генотипових варіантів у 188 досліджуваних особин мідій. З них виявлено 80 унікальних генотипів, які були характерні лише для особин з окремих угруповань мідій. Електрофоретичні спектри на яких можна чітко побачити гомозиготні генотипи або гетерозиготні генотипи представлено на рис. 5.2 і рис. 5.3.

За МС-локусом *Mch 5* було визначено 25 генотипових варіантів, з яких 12 гомозиготних і 13 гетерозиготних генотипів. Найбільш поширеним за МС-локусом *Mch 5* є гомозиготний генотип, який характеризується алелями розміром 241 п.н. і був відмічений у 40 особин мідій. Найбільшу кількість особин із цим генотипом спостерігали в локації А (14 особин), найменшу – в локації Е (одна особина) та локаціях H і J (по дві особини). За досліджуваним локусом в угрупованнях мідій було виявлено 13 унікальних генотипів: 239–243 п.н., 237–243 п.н., 241–257 п.н. – в локації А; 239–241 п.н. – в локації В; 223–223 п.н. – в локації Е; 229–233 п.н., 249–249 п.н., 249–253 п.н., 261–261 п.н. – в локації G; 243–245 п.н., 249–265 п.н., 257–287 п.н. – в локації H; 233–245 п.н. – в локації J.

Загальна кількість генотипових варіантів, виявлених з використанням МС-локуса *Mch 8* становила 41; ці варіанти розподілилися на гомозиготні – 11 і гетерозиготні – 30 генотипів. Найбільш поширеним за МС-локусом *Mch 8* є

гомозиготний генотип, який характеризується алелями розміром 213 п.н. і був відмічений у 34 особин мідій. Найбільшу кількість особин із даним генотипом спостерігали в локації С (9 особин) та В (8 особин), найменшу – в локації D, Е, Н, J (одна особина). Слід зазначити, що особин з генотипом 213–213 п.н. ми не спостерігали в локації G. За досліджуванним локусом виявлено 32 унікальні генотипи: 209–213 п.н., 215–217 п.н., 213–245 п.н., 217–245 п.н. – в локації А; 207–217 п.н. – в локації В; 207–213 п.н. – в локації С; 203–209 п.н., 203–213 п.н., 207–223 п.н. – в локації D; 195–201 п.н., 217–225 п.н., 215–227 п.н., 227–233 п.н., 221–237 п.н. – в локації Е; 211–215 п.н. – в локації F; 185–223 п.н., 195–217 п.н., 197–217 п.н., 197–223 п.н., 197–227 п.н., 203–223 п.н., 203–229 п.н., 209–223 п.н., 211–225 п.н., 227–227 п.н. – в локації G; 193–213 п.н., 213–223 п.н., 225–237 п.н., 237–237 п.н. – в локації H; 213–229 п.н., 223–229 п.н., 229–237 п.н. – в локації J.

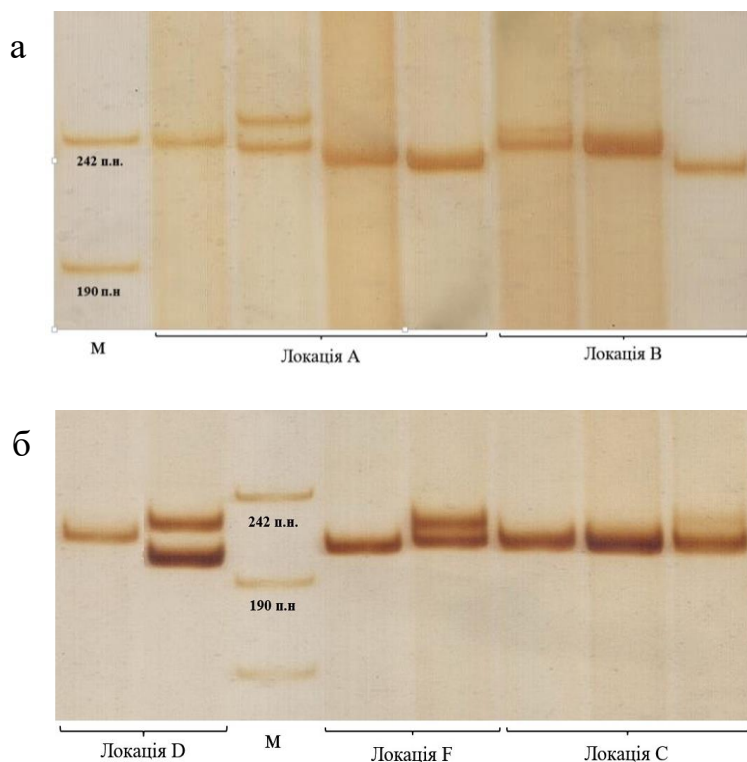


Рис. 5.2. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації ДНК чорноморської мідії *M. galloprovincialis* з праймерами до мікросателітних локусів *Mch 5* (а) і *Mch 8* (б). М – маркер молекулярної маси *pUC 19 / Msp I*.

За МС-локусом *MT 203* було виявлено 37 генотипових варіанти, з яких 10 гомозиготних і 27 гетерозиготних генотипів. Найбільш поширеними за МС-локусом *MT 203* є два гомозиготних генотипи, які характеризуються алелями розміром 179 п.н. (відмічений у 21 особини) і 185 п.н. (відмічений у 26 особин). Найбільшу кількість особин мідій із генотипом 179-179 п.н. спостерігали в локації G (12 особин), найменшу – в локації B (одна особина). Найбільшу кількість особин мідій із генотипом 185-185 п.н. спостерігали в локаціях E (6 особин), A і F (5 особин), найменшу – в локації C і D (одна особина). Слід зазначити, що особин з генотипом 179–179 п.н. не спостерігали в локаціях: C, D, E, J. Також в локації J не спостерігали генотип 185–185 п.н. За досліджуваним МС-локусом *MT 203* було виявлено 17 унікальних генотипів: 181–189 п.н., 185–189 п.н., 185–195 п.н., 195–229 п.н., 195–237 п.н., 215–243 п.н. – в локації A; 187–189 п.н., 187–191 п.н. – в локації C; 181–183 п.н., 183–191 п.н., 181–195 п.н. – в локації D; 181–191 п.н. – в локації F; 179–185 п.н. і 179–187 п.н. – в локації G; 195–217 п.н. – в локації H; 167–175 п.н. і 175–183 п.н. – в локації J.

За МС-локусом *MT 282* було виявлено 36 генотипових варіантів, з яких 9 гомозиготних і 27 гетерозиготних генотипів. Найбільш поширеним за МС-локусом *MT 282* є гомозиготний генотип, який характеризується алелями розміром 334 п.н. і був відмічений у 32 особин мідій. Найбільшу кількість особин із цим генотипом спостерігали в локаціях G (7 особин) і B (6 особин), найменшу – в локації D (одна особина). За досліджуваним локусом було виявлено 18 унікальних генотипів: 332–342 п.н., 332–344 п.н., 334–348 п.н., 350–364 п.н. – в локації A; 332–340 п.н. і 336–348 п.н. – в локації C; 332–364 п.н. і 336–654 п.н. – в локації D; 332–354 п.н. і 348–348 п.н. – в локації E; 336–340 п.н., 342–354 п.н., 344–354 п.н. – в локації G; 338–340 п.н., 338–354 п.н., 340–368 п.н., 350–372 п.н. – в локації H; 354–354 п.н. – в локації J.

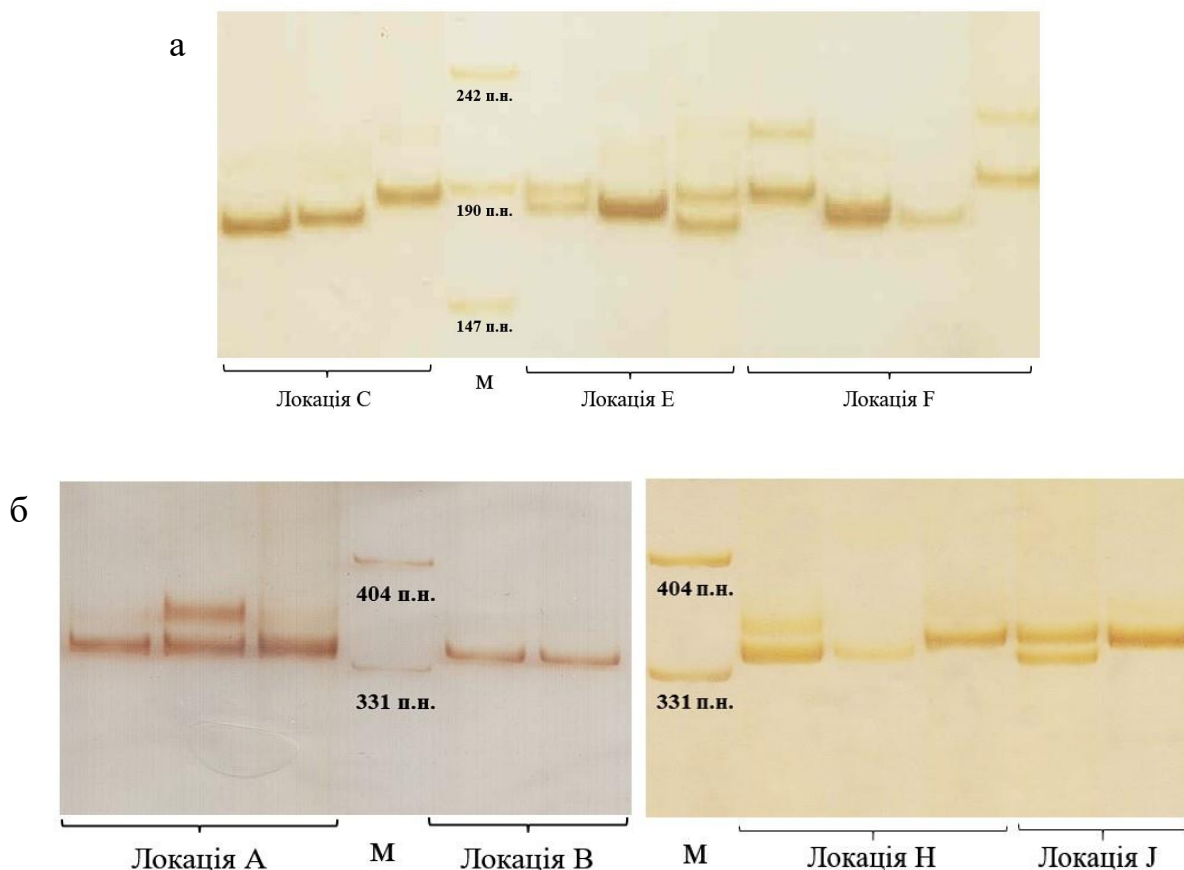


Рис. 5.3. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації ДНК особин мідії ПЗЧМ (А, В, С, Е, F), Північного моря (Н) та Ватового моря (J) з праймерами до мікросателітних локусів *MT 203* (а) і *MT 282* (б). М – маркер молекулярної маси *pUC 19 / Msp I*.

Загалом за досліджуваними локусами чорноморські мідії характеризувалися 42 унікальними генотипами, серед яких найбільшу кількість унікальних генотипів за чотирма МС-локусами було виявлено в локації А (17 генотипів), а найменшу кількість – в локаціях В і F (два генотипи). Досліджувані особини мідій з локації G (Балтійське моря) характеризувалися 19 унікальними генотипами, локації Н (Північне море) – 12 унікальними генотипами, локації J (Ватове море) – 7 унікальними генотипами.

РОЗДІЛ 6. ПОЛІМОРФІЗМ І РОЗПОДІЛ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА БІОТРАНСФОРМАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ У *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* З ПЗЧМ

6.1. Поліморфізм, тканинний розподіл та активність ензимів антиоксидантної системи у *Mytilus galloprovincialis*

Знання про особливості захисних механізмів мідій є важливим для розуміння біології цих організмів і розробки методів моніторингу навколишнього середовища. Особливу роль у системі екологічного моніторингу виконує біологічний моніторинг, який пов'язаний з двома основними напрямками – біоіндикацією та біотестуванням. Вид *Mytilus galloprovincialis*, як організм-біофільтратор, що веде малорухливий спосіб життя, придатний для використання не лише як організм-індикатор у природних умовах (Красота, 2015), а й як тест-об'єкт при оцінці екологічного стану морського середовища в лабораторних умовах (Nikolić et al., 2019). Так, на клітинному рівні стабільність мембран лізосом клітин гемолімфи моллюсків є інформативним індикатором «здоров'я» мідій, а деструкція лізосомальної мембрани – майже універсальним маркером стресу (Bakhmet et al., 2019).

Досліджувані в роботі ензими відіграють значну роль у забезпеченні захисту від пошкоджень тканин, змін фізико-хімічних властивостей клітинних мембран, погіршень функцій клітин і організму в цілому. Ці процеси відбуваються в першу чергу внаслідок надлишкової продукції організмом активних форм кисню (АФК) (Manduzio et al., 2005), які утворюються під час аеробного дихання і включають пероксиди, супероксиди, гідроксильні радикали та синглетний кисень. АФК можуть взаємодіяти з багатьма біологічними молекулами, включаючи білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, необоротно змінюючи просторову конформацію та функцію ураженої молекули (Bartosz, 2009). Рівень АФК контролюється різними ензимними системами, які запобігають пошкодженню структур живих істот.

Антиоксидантні ензими відіграють першорядну роль в адаптації організмів до будь-яких несприятливих факторів зовнішнього середовища, забезпечуючи збереження балансу АФК у нормі (Valavanidis et al., 2006; Alves de Almeida et al., 2007; Lushchak, 2011). Крім того, антиоксидантні ензими беруть участь у контролі специфічних АФК-опосередкованих сигнальних шляхів у клітинах (Finkel, 2011; Sies, Jones, 2020).

Супероксиддисмутаза (SOD) є першим ензимом детоксикації та найпотужнішим антиоксидантом у клітині, діючи як компонент першої лінії захисту від АФК. Він каталізує дисмутацію двох молекул супероксид-аніон-радикалів ($\bullet\text{O}_2$) до перекису водню (H_2O_2) і молекулярного кисню (O_2), що робить потенційно шкідливий супероксид-аніон-радикал менш небезпечним. Його небезпека пов'язана не тільки з прямою взаємодією з важливими органічними полімерами, а й з ініціацією ланцюгових реакцій утворення різноманітних реакційноздатних АФК (наприклад, гідроксильного радикала ($\bullet\text{OH}$), ліпідного радикала ($\bullet\text{L}$), пероксинітрату (ONOO^-)) (Ighodaro, Akinloye, 2018).

Досліджуваний ензим належить до класу оксидоредуктаз і є металопротеїном. В еукаріотичних клітинах цей ензим існує в кількох ізоформах: цитозольній Cu, Zn-вмісній (Cu/Zn-SOD), мітохондріальній Mn-вмісній (Mn-SOD) і високомолекулярній позаклітинній (EC-SOD). Вміст і активність цих ізоформ у різних тканинах істотно відрізняються (Geret et al., 2004; Manduzio et al., 2004; Fernández et al., 2009; Wu et al., 2017).

Загалом в досліджуваних органах мідій було виявлено до п'яти форм SOD (рис. 6.1), які можуть бути продуктами експресії різних генів – SOD 1, SOD 2, SOD 3, а отже, їх білкових продуктів Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, EC-SOD (Ighodaro, Akinloye, 2018). Найбільшу активність на одиницю маси тканини та різноманітність варіантів цього ензиму спостерігали в гепатопанкреасі (рис. 6.1, табл. 6.1). Тканини м'язів ноги також мали високу активність SOD, однак в їх електрофоретичному спектрі були відсутні деякі форми, наявні в гепатопанкреасі: найбільш швидко рухливі та найповільніша.

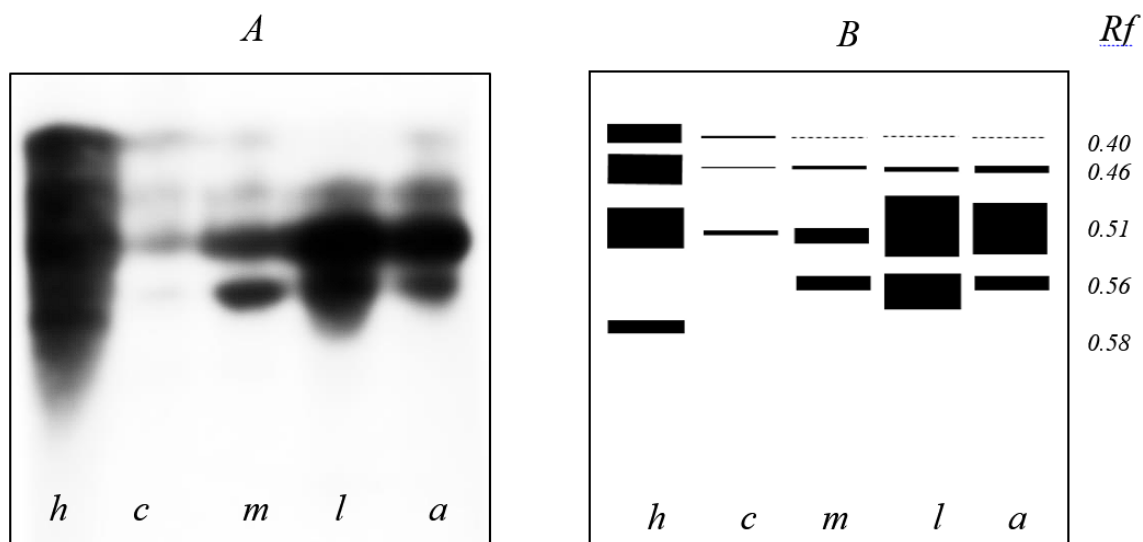


Рис. 6.1. Електрофоретичний профіль супероксиддисмутази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантія, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Серед гідробіонтів Чорного моря активність супероксиддисмутази досліджено у рапани *Rapana venosa* (Єршова та ін., 2014) та креветки *Palaemon elegans* (Petrov et al., 2022).

Супероксиддисмутазною активністю, хоча й незначною, володіє ще один білок – фероксидаза. Цей білок добре вивчений у ссавців, дані про його роль у молюсків вкрай обмежені (Nemoto et al., 2019). На відміну від SOD, фероксидаза відновлює супероксид до води та кисню без утворення АФК – пероксиду водню (Bannister et al., 1980). Цей ензим перетворює двовалентне залізо в тривалентне, тим самим блокуючи ланцюгові реакції Габера-Вейса і Фентона (Bannister et al., 1980), які є джерелом утворення гідроксильного радикалу ($\bullet\text{OH}$). Завдяки цьому фероксидаза захищає мембрани ззовні. Відомо, що у ссавців фероксидаза діє як позаклітинний ензим, який нейтралізує супероксидні радикали (Goldstein et al., 1982; Sergeev et al., 1993), доповнюючи внутрішньоклітинну SOD.

Показано (Zhang et al., 2013), що чотири субодиниці феритину (PyFer1, PyFer2, PyFer3 і PyFer4), клоновані з гребінця Йессо, *Patinopecten yessoensis*, мають виражену фероксидазну активність. Нещодавно було ідентифіковано новий ген субодиниці феритину (PvFer) з азіатської зеленої мідії *Perna viridis* (Sumithra et al., 2021).

За результатами нашого дослідження у п'яти органах *M. galloprovincialis* було виявлено 6 форм білка з фероксидазною активністю (рис. 6.2, табл. 6.1). Найбільшу його активність на одиницю маси тканини спостерігали в аддукторі й ктенідіях. Взаємна доповнюваність супероксиддисмутази і фероксидази демонструється існуванням негативного зв'язку активності обох ензимів (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена $r = -0,50$ при $n = 5, p = 0,05$), хоч і слабого (середній ступінь зв'язку за шкалою Чеддока)

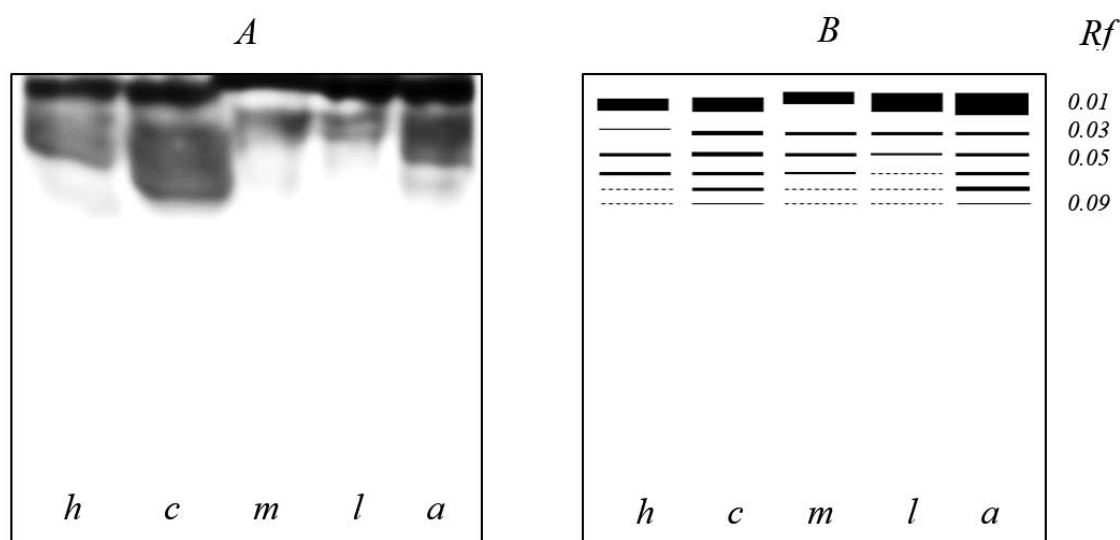


Рис. 6.2. Електрофоретичний профіль фероксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантія, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Супероксиддисмутаза, будучи компонентом антиоксидантної системи (АОС), одночасно є також прооксидантом, оскільки в результаті її функціонування

виникає така АФК, як перекис водню. Ще одними проксидантами є НАДН- і НАДФН-оксидази, продуктами реакції яких є пероксид і супероксидний радикал. НАДН-оксидаза бере участь в окислювальному фосфорилуванні субстратів, відповідальних за енергозабезпечення клітин. Всього у спектрах досліджуваних органів мідій спостерігалось до 6 форм НАДН-оксидази (рис. 6.3, табл. 6.1).

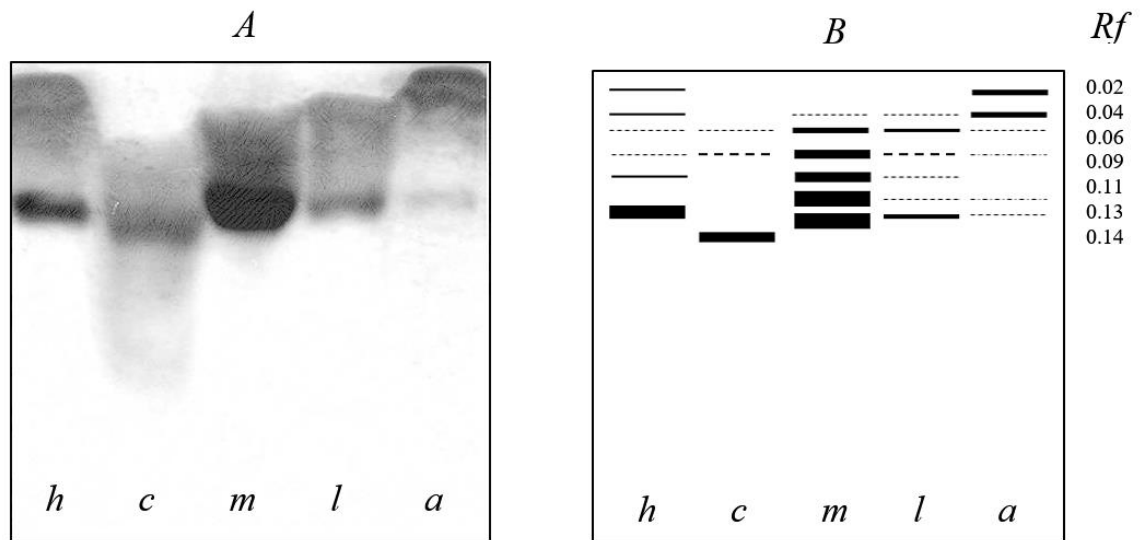


Рис. 6.3. Електрофоретичний профіль НАДН-оксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Найвищу активність (на масу тканини) НАДН-оксидази спостерігали у мантиї досліджуваних молюсків (рис. 6.3, табл. 6.1). Можливо, це пов'язано зі значною енергетичною активністю цього органу у здійсненні різноманітних енергоємних процесів, наприклад, синтезу та секреції речовин для побудови мушлі (Shcherbak et al., 1996). Спеціальні епітеліальні клітини мантиї формують структури, які здійснюють ендоцитоз та імунні процеси, які необхідні для захисту від паразитів (Gerdol et al., 2018). Крім того, зберігання поживних речовин (головним чином глікогену), акумулювання металів і органічних забруднювачів, що відбувається в палліальних клітинах, також є енергоємними процесами (Yurimoto, 2015).

Якщо НАДН-оксидаза генерує супероксидний радикал і перекис водню всередині клітини, то у позаклітинному просторі та ззовні плазматичної мембрани це робить НАДФН-оксидаза. В органах мідії виявлено до 8 форм НАДФН-оксидази (рис. 6.4, табл. 6.1).

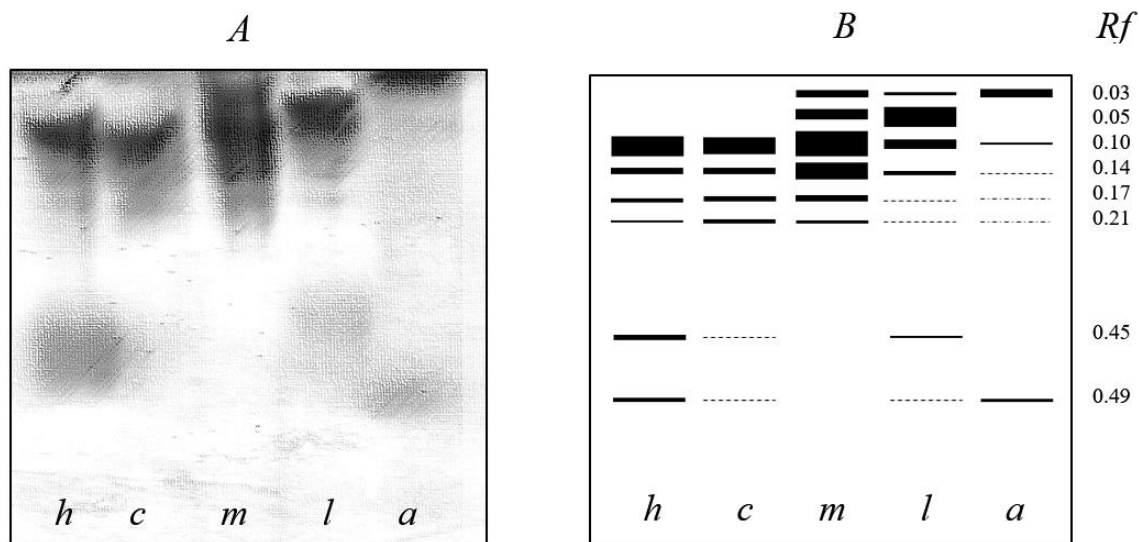


Рис. 6.4. Електрофоретичний профіль НАДФН-оксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. R_f – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Як і у випадку НАДН-оксидази, найбільша активність НАДФН-оксидази спостерігалася в мантиї. Це може бути обумовлено двома причинами. По-перше, клітини мантиї безпосередньо контактують із зовнішнім середовищем і «виконують завдання» сигналізувати про стан довкілля іншим клітинам. По-друге, як зазначалося вище, клітини мантиї беруть участь у захисті від патогенів, для чого використовуються супероксидні радикали та перекис водню.

Наступною ланкою антиоксидантного захисту є контроль вмісту пероксидів. У досліджуваних органах мідії було виявлено всі відомі ензими, що руйнують пероксиди. Важливість цих багатофункціональних білків полягає не тільки у нейтралізації руйнуючої дії АФК. Регулюючи кількість пероксидів, вони

впливають на їх сигнальну роль (Sies, Jones, 2020). Класична пероксидаза нейтралізує токсичні речовини (наприклад, феноли), використовуючи їх як донори протонів для відновлення пероксидів (Cong et al., 2005). Крім того, пероксидаза може функціонувати як мієлопероксидаза, створюючи гіпохлорит-аніони, які знищують патогенні мікроорганізми. Показано (Yang et al., 2006), що активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази важлива для забезпечення оптимального окисно-відновного стану тканин.

Глутатіонпероксидаза (представлена на рис. 6.5), відіграє важливу роль у метаболізмі трипептиду глутатіону (GSH), який є одним із найважливіших внутрішньоклітинних механізмів антиоксидантного захисту. Міститься в цитозолі, мітохондріях і ядрі. Субстратом глутатіонпероксидази є H_2O_2 або органічні пероксиди (ROOH). Слід зазначити, що глутатіонпероксидаза має набагато вищу спорідненість до H_2O_2 , ніж каталаза, і може видаляти H_2O_2 навіть при низьких концентраціях пероксидів (Kohen, Nyska, 2002).

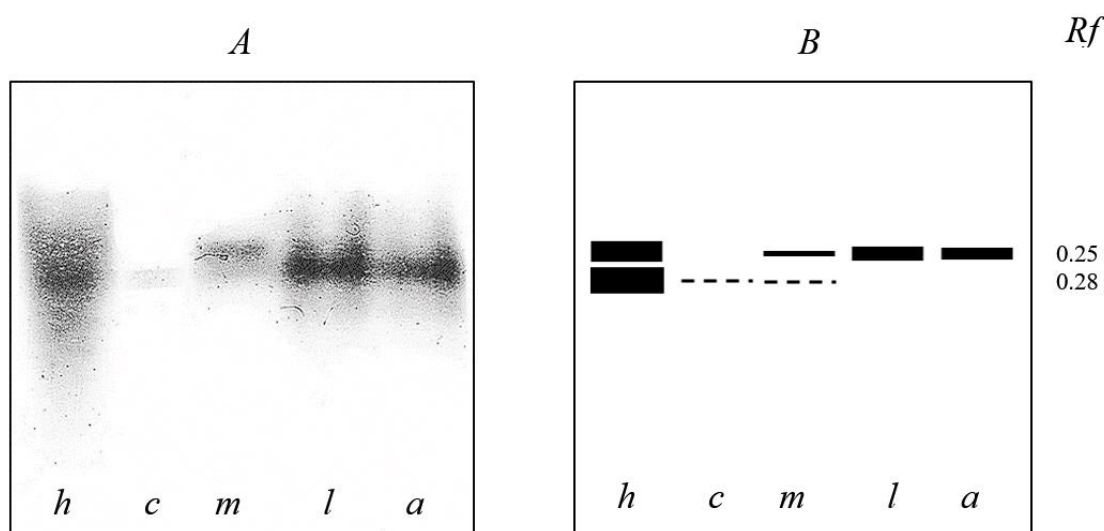


Рис. 6.5. Електрофоретичний профіль глутатіонпероксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (A – електрофореграма (зображення інвертоване), B – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантія, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Глутатіонпероксидаза у гепатопанкреасі й мантиї *M. galloprovincialis* представлена двома формами (рис. 6.5, табл. 6.1). В інших органах виявлено лише по одній формі. Найбільша активність у перерахунку на одиницю маси тканини була у гепатопанкреасі.

Класична пероксидаза, будучи ензимом групи оксидоредуктаз, може каталізувати окислення різних органічних і неорганічних субстратів, реагуючи з перекисом водню та подібними молекулами (De Oliveira et al., 2021). Завдяки цьому вона не тільки знищує пероксид, але й є важливим елементом системи біотрансформації ксенобіотиків. У досліджуваних органах *M. galloprovincialis* пероксидаза мала до 11 форм (рис. 6.6, табл. 6.1): у тканинах аддуктора – 11, ктенідіях і мантиї – по 10, гепатопанкреасу – 8. Найменше форм пероксидази спостерігалось у нозі (три форми). За активністю пероксидаз органи розташовувалися наступним чином: мантия > ктенідії ≈ аддуктори > гепатопанкреас ≈ нога.

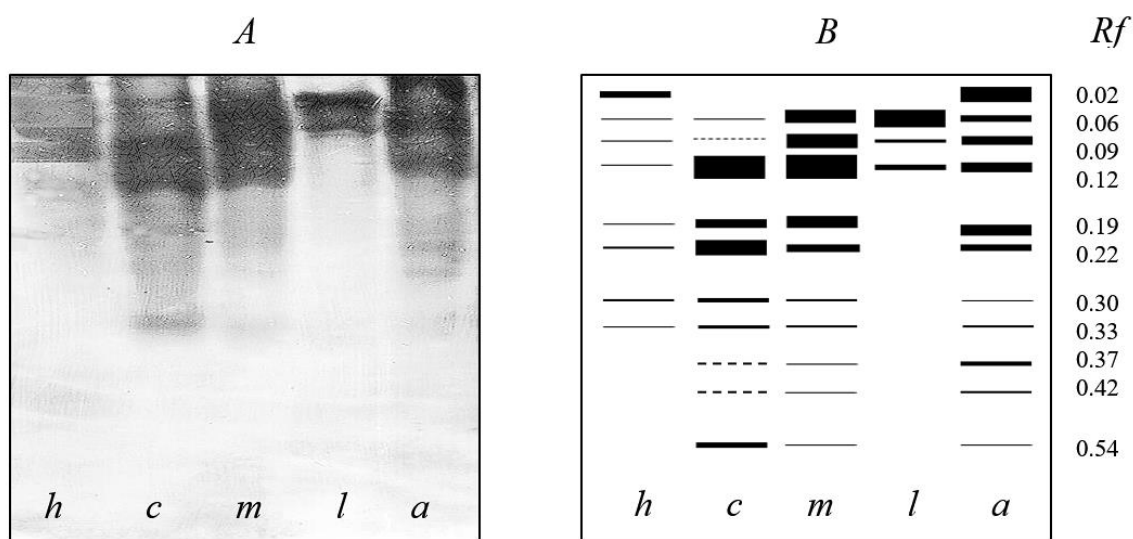


Рис. 6.6. Електрофоретичний профіль пероксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Антиоксидантні ензими пероксиредоксини являють собою різноманітну групу ензимів, що нейтралізують пероксид. Найбільша кількість форм цього ензиму представлена в ктенідіях і мантиї (відповідно шість і п'ять форм), а найбільшу активність виявлено в мантиї та ктенідіях *M. galloprovincialis* (рис. 6.7, табл. 6.1).

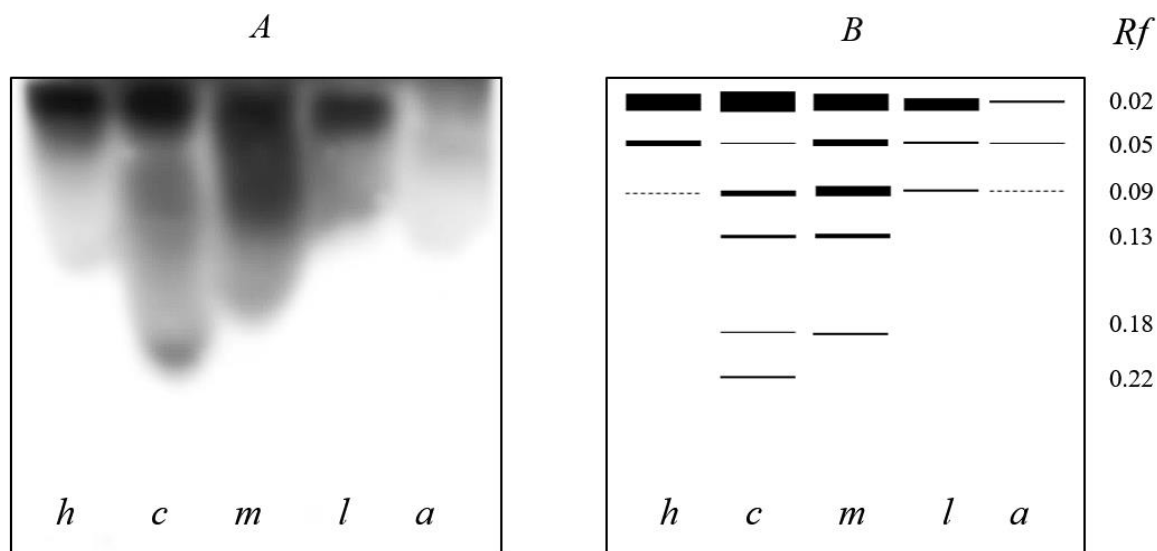


Рис. 6.7. Електрофоретичний профіль пероксиредоксинів в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Наступним досліджуваним антиоксидантним внутрішньоклітинним ензимом є каталаза. Особливістю каталази є те, що вона не потребує в якості донорів протонів певних додаткових речовин або молекулярних груп для руйнування пероксидів (Alfonso-Prieto et al., 2009), на відміну від охарактеризованих вище ензимів. Глутатіонпероксидаза використовує відновлений глутатіон, пероксидаза – фенольні сполуки, а пероксиредоксини – SH-групи. У зв'язку з цим зазначені ензими для подальшої своєї роботи потребують відновлення важливих для життєдіяльності компонентів, зокрема таких, що містять активні SH-групи (в першу чергу відновлений глутатіон).

Каталаза ж для відновлення однієї молекули пероксиду використовує іншу молекулу пероксиду. Таким чином, каталаза є «економічним» ензимом і не витрачає цінні для життєдіяльності речовини. У досліджуваних органах *M. galloprovincialis* було виявлено три електрофоретичні форми каталази (рис. 6.8, табл. 6.1). Найбільша активність каталази на одиницю маси спостерігалася в тканинах гепатопанкреасу, найменша – у мантиї й аддукторі.

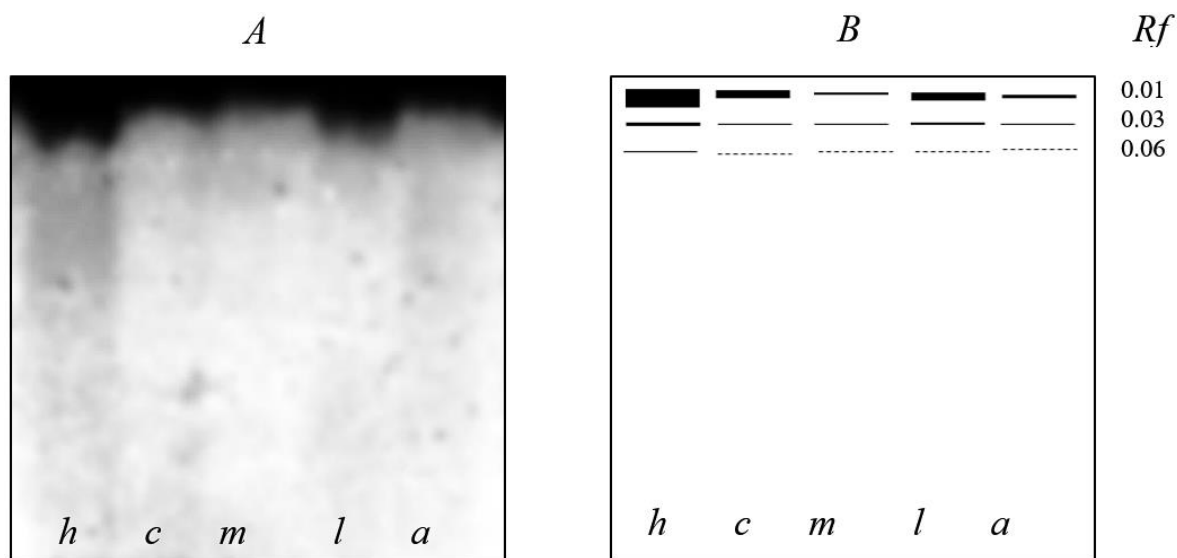


Рис. 6.8. Електрофоретичний профіль каталази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма (зображення інвертоване), В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Слід зазначити, що в кожному органі нейтралізація надлишку пероксидів здійснюється з переважним використанням тих чи інших ензимів. На основі порівняння активностей ензимів, що розкладають пероксид у різних органах *M. galloprovincialis*, можна зробити певні припущення. Оскільки активність розраховували в умовних одиницях, то внесок кожного ензиму в пероксидруйнуючу дію оцінювали за рангом його активності в різних органах мідій (табл. 6.1).

Ферментативна активність та кількість форм захисних ензимів у досліджуваних органах *M. galloprovincialis*

Ензими	Органи														
	Гепатопанкреас			Ктенідія			Мантія			Нога			Мускул-аддуктор		
	<i>Am</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>Am</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>Am</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>Am</i>	<i>R</i>	<i>N</i>	<i>Am</i>	<i>R</i>	<i>N</i>
SOD	23,33 ± 0,38	1	4	1,97 ± 0,05	5	3	7,47 ± 0,14	4	4	23,24 ± 0,20	2	4	16,49 ± 0,13	3	4
CP	4,71 ± 0,06	5	6	7,02 ± 0,15	2	6	4,92 ± 0,04	4	6	5,87 ± 0,04	3	6	8,55 ± 0,06	1	6
GPx	4,91 ± 0,16	1	2	0,04 ± 0,01	5	1	1,12 ± 0,01	4	2	4,27 ± 0,22	2	1	2,67 ± 0,41	3	1
PER	5,89 ± 0,23	5	8	15,71 ± 0,51	3	10	17,69 ± 0,35	1	10	5,97 ± 0,10	4	3	16,06 ± 0,30	2	11
PRX	4,88 ± 0,13	3	3	7,44 ± 0,03	2	6	9,11 ± 0,09	1	5	3,69 ± 0,01	4	3	0,81 ± 0,01	5	3
CAT	3,73 ± 0,03	1	3	1,54 ± 0,02	3	3	0,57 ± 0,01	5	3	1,70 ± 0,03	2	3	0,68 ± 0,01	4	3
GSR	1,84 ± 0,03	3	3	3,72 ± 0,03	2	3	4,73 ± 0,21	1	3	0,47 ± 0,03	5	2	1,78 ± 0,15	4	2
OXN	7,30 ± 0,32	2	6	4,69 ± 0,28	3	3	31,28 ± 0,19	1	6	4,46 ± 0,12	5	6	4,49 ± 0,05	4	6
NOX	15,17 ± 0,13	2	6	12,40 ± 0,13	4	6	24,01 ± 0,14	1	6	13,96 ± 0,06	3	8	5,55 ± 0,08	5	8
CA	5,18 ± 0,06	4	4	8,90 ± 0,08	2	1	6,79 ± 0,08	3	4	2,95 ± 0,03	5	4	11,86 ± 0,05	1	4
AMOX	2,46 ± 0,05	3	5	4,21 ± 0,04	2	5	7,15 ± 0,02	1	5	1,08 ± 0,02	5	5	1,40 ± 0,02	4	5
EST	30,00 ± 0,05	1	7	7,53 ± 0,06	4	7	23,71 ± 0,04	2	8	13,96 ± 0,09	3	8	3,37 ± 0,04	5	6
GST	3,18 ± 0,04	1	2	0,37 ± 0,01	4	1	0,53 ± 0,01	2	2	0,35 ± 0,01	3	1	0,05 ± 0,01	5	1

Примітка: *Am* – сумарна ферментативна активність усіх форм ензиму (од.акт./мг); *R* – ранг активності певного ензиму у цьому органі в порівнянні з іншими органами; *N* – кількість молекулярних форм ензиму, виявлених у цьому органі. Скорочене позначення ензиму: SOD – супероксиддисмутаза; CP – фероксидаза; GPx – глутатіонпероксидаза; PER – пероксидаза; PRX – пероксиредоксини; CAT – каталаза; GSR – глутатіонредуктаза; OXN – НАДН-оксидаза; NOX – НАДФН-оксидаза; CA – карбоангідраза; AMOX – амінооксидаза; EST – естерази; GST – глутатіон-S трансфераза.

Так, у гепатопанкреасі пероксиди нейтралізуються в першу чергу за допомогою глутатіонпероксидази і каталази, у ктенідіях – пероксиредоксинами. У тканинах мантиї за порівняння з іншими органами головну функцію по нейтралізації пероксидів виконують пероксиредоксини і класична пероксидаза. Провідна роль у м'язах у захисті від надлишку пероксидів належить каталазі, глутатіонпероксидазі (нога) та пероксидазі (аддуктор).

Як зазначалося вище, більшість пероксидруйнуючих ензимів потребують донорів протонів задля свого відновлення. Важливим таким донором є відновлений глутатіон. Його запас постійно відновлюється за допомогою ще одного компонента АОС – глутатіонредуктазою. У гепатопанкреасі, ктенідіях і мантиї *M. galloprovincialis* було виявлено три форми глутатіонредуктази, а в нозі й аддукторі – дві. Найбільша його активність на одиницю маси спостерігалась у мантиї і ктенідіях, найменша – у нозі (рис. 6.9, табл. 6.1).

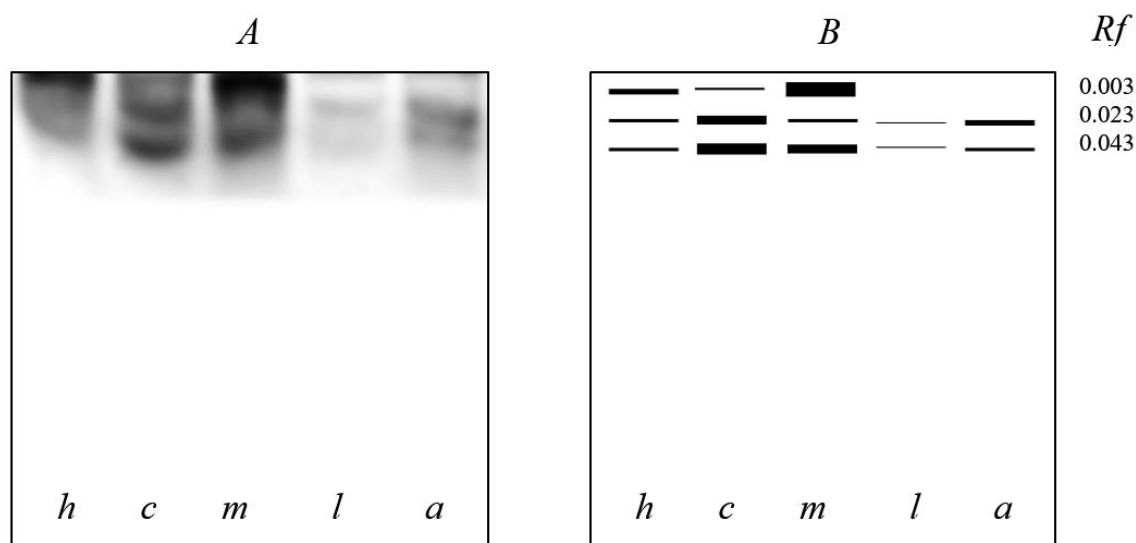


Рис. 6.9. Електрофоретичний профіль глутатіонредуктази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма, В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Таким чином, всі досліджувані органи *M. galloprovincialis* мають повний набір антиоксидантних ензимів, а відмінності між органами, вочевидь, пов'язані із функціями, що вони виконують. Злагодженість АОС окремих органів дозволяє

успішно протистояти стресовим впливам з боку довкілля всьому організму в цілому. Низка досліджень також демонструє специфіку розташування по органах двостулкових молюсків різних антиоксидантних ензимів (Regoli, Giuliani, 2014; Marques et al., 2016).

6.2. Поліморфізм, тканинний розподіл та активність ензимів біотрансформації у *Mytilus galloprovincialis*

Розглянуті вище антиоксидантні ензими не тільки регулюють і нейтралізують АФК, що утворюються в результаті власної діяльності, але й беруть участь у нейтралізації різноманітних зовнішніх органічних забруднювачів (речовин з прооксидантними властивостями, окислювальних ксенобіотиків тощо) (Gozhenko et al., 2009). Окрім них, живі організми мають цілу спеціальну систему нейтралізації ксенобіотиків (Yanovych, Yanovych, 2011). У нашій роботі наведено результати визначення таких ензимів біотрансформації: глутатіон-S трансферази, естераз, амінооксидази (мідьвмісної) та карбоангірази.

У роду *Mytilus* серед ензимів біотрансформації ксенобіотиків основна увага приділяється вивченню глутатіон-S трансфераз (Trisciani et al., 2012) і естераз (Faucet et al., 2004). Це ключові ензими I та II фаз біотрансформації ксенобіотиків у живих клітинах (Sipes, Gandolfi, 1986; Li et al., 2007).

Глутатіон-S трансфераза була виявлена у всіх досліджуваних органах мідій. У гепатопанкреасі активність цього ензиму значно вища, ніж в інших органах. Крім того, поліморфізм електрофоретичного спектру глутатіон-S трансферази вищий у гепатопанкреасі: обидві форми ензиму в гепатопанкреасі експресувалися приблизно однаково, тоді як у мантиї переважав прояв однієї форми (табл. 6.1).

Естерази являють собою велике родину ензимів, що гідролізують ефірні зв'язки і вважаються одними з найбільш важливих у метаболізмі ксенобіотиків (Li et al., 2007). Завдяки значній кількості форм з різною субстратною специфічністю, естерази нейтралізують багато шкідливих для організму сполук. Серед

досліджених ензимів, естерази разом із пероксидазою та НАДФН-оксидазою мають найбільшу кількість ММФ (рис. 6.10, табл. 6.1). За активністю естерази на одиницю маси органи розташовувалися наступним чином: гепатопанкреас > мантия >> нога > ктенідія > мускул-аддуктор.

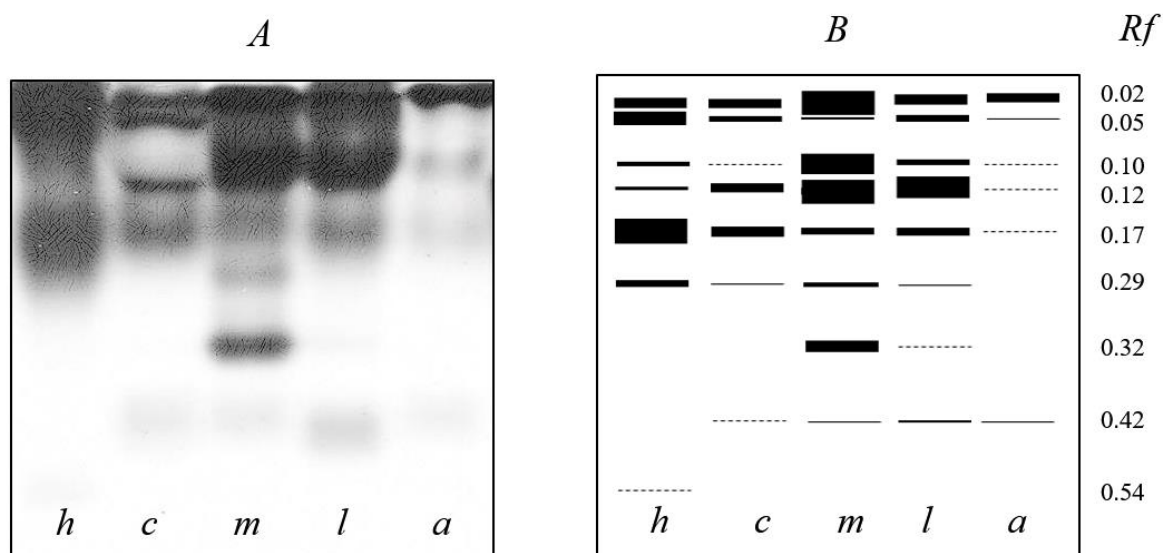


Рис. 6.10. Електрофоретичний профіль неспецифічних естераз в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма, В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Аміноксидази беруть участь у метаболічному процесі біогенних амінів. Ці ензими класифікуються на два класи на основі їхніх простетичних груп: мідьвмісні аміноксидази (ЕС 1.4.3.6) і флавіновмісні аміноксидази (ЕС 1.4.3.4). Основними мідьвмісними аміноксидазами є первинна аміноксидаза і діаміноксидаза, які широко поширені в природі. У морських гідробіонтів: *Scylla paramamosain* (Liu et al., 2018), *Danio rerio* (Setini et al., 2005), *Cyprinus carpio* (Haruyo Sugimoto et al., 2010) досліджується флавіновмісна аміноксидаза, а саме моноаміноксидаза (МАО), яка є у більшості живих істот.

У ссавців МАО існує у двох ізоформах (МАО-А і МАО-В), які є димерами у своїх мембранозв'язаних формах (Edmondson et al., 2004). Було показано (Bach et al., 1988), що МАО-А і МАО-В є двома різними білками, які кодуються різними

генами, мають ідентичну екзон-інтронну організацію та регулюються різними генними регуляторами. Незважаючи на схожість, MAO-A і MAO-B відрізняються тканинним розподілом і субстратною специфічністю (Grimsby et al., 1990).

В експериментах на двостулкових і червононогих молюсках, *Mytilus edulis* і виду роду *Helix*, не було отримано доказів присутності аміноксидази (Blaschko, Hawkins, 1952). Однак, підтверджується наявність амінооксидазної активності в гомогенатах головоногих молюсків, *Sepia officinalis* та *Octopus vulgaris*.

За результатами нашого дослідження, загалом у п'яти органах *M. galloprovincialis* виявлено до 6 форм мідьвмісної аміноксидази (або діаміноксидази) (рис. 6.11, табл. 6.1). Найвища активність ензиму спостерігалася в мантиї та ктенідіях, найменша – у м'язовій тканині (нозі й аддукторі).

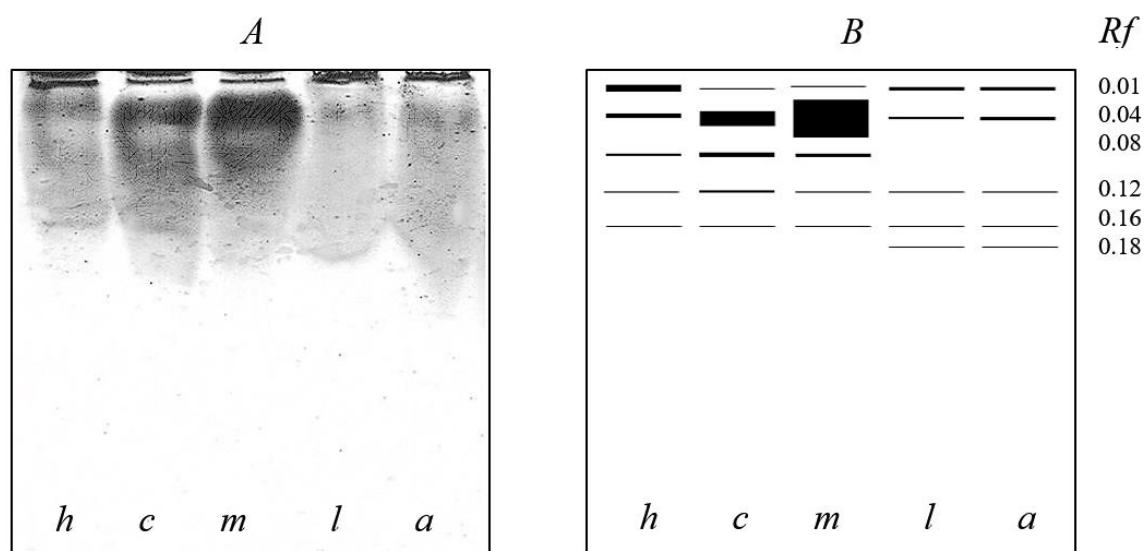


Рис. 6.11. Електрофоретичний профіль амінооксидази в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма, В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Ще одним ензимом, який можна віднести до захисних, є карбоангідраза. З одного боку, карбоангідраза відповідає за побудову мушлі, необхідної для захисту м'якого тіла молюска від зовнішнього середовища, а з іншого – забезпечує видалення з організму CO_2 , що виникає внаслідок клітинного дихання, та

стійкість моллюсків до змін кислотності та солоності води (Rodriguez-Navarro et al., 2019; Wong et al., 2020).

Всього в тілі *M. galloprovincialis* виявлено 6 ММФ карбоангідрози, але кожен орган мав специфічний склад форм досліджуваного ензиму (рис. 6.12, табл. 6.1).

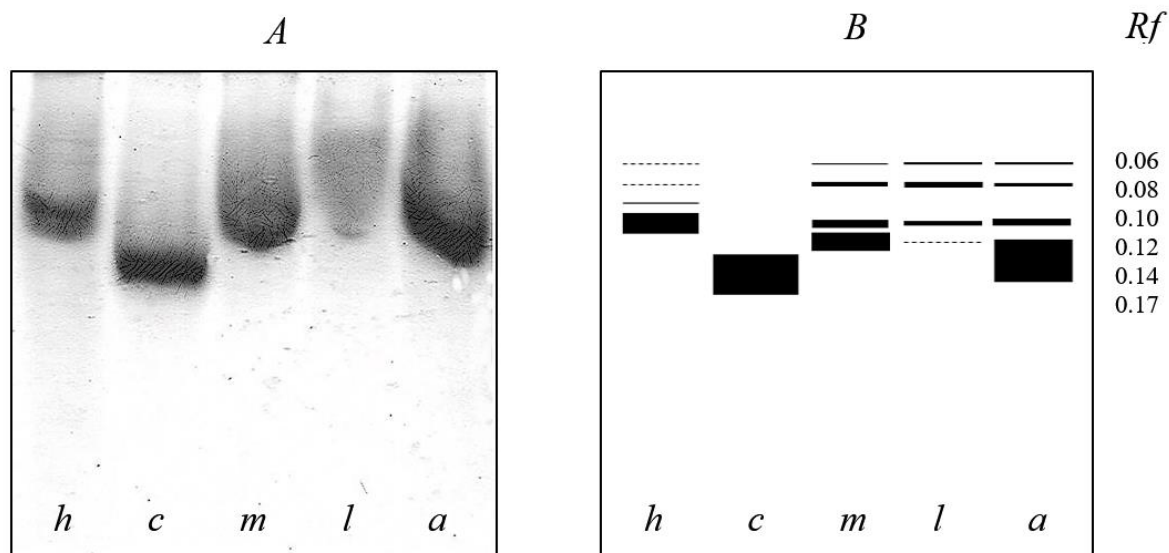


Рис. 6.12. Електрофоретичний профіль карбоангідрози в різних органах *M. galloprovincialis* (А – електрофореграма, В – схема електрофореграми). На треках: *h* – гепатопанкреас, *c* – ктенідії, *m* – мантия, *l* – нога, *a* – мускул-аддуктор. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Найбільше значення активності карбоангідрози на одиницю маси було відзначено в аддукторі, у тканинах якого набір електрофоретичних форм карбоангідрози збігався з таким у мантиї. Характерною особливістю спектру карбоангідрози в цих органах є значне переважання (від 60 до 80% від загального спектру) швидкої форми. Ймовірно, ця форма пов'язана з процесом біокальцифікації (Le Roy et al., 2016). Друге місце за активністю цього ензиму посідали ктенідії, у яких була наявна швидкорухлива форма, якої не було в жодному іншому органі. Можливо, основна функція цієї форми карбоангідрози пов'язана з видаленням CO_2 з організму. Найнижча активність карбоангідрози спостерігалася у гепатопанкреасі та особливо в нозі.

Відповідно до літератури (Ozensoy Guler et al., 2016; Perfetto et al., 2017), надродина карбоангідраз включає сім різних класів, відомих як α , β , γ , δ , ζ , η і θ . На даний момент (Perfetto et al., 2017) було експериментально очищено α -СА та біохімічно охарактеризовано тканину мантиї молюска *M. galloprovincialis*. У поліхет карбоангідрази належать переважно до сімейства α -СА, однак члени сімейства β -СА були ідентифіковані в коралах (Bertucci et al., 2013). Як і в більшості молюсків, α -СА бере участь у процесах біомінералізації, що призводить до випадання карбонату кальцію в мушлі мідії. Очищена α -СА *M. galloprovincialis* є або димером, або є подібною до білка, ідентифікованого та описаного в *Tridacna gigas* (Leggat et al., 2005), який може мати два різних домени карбоангідрази у своєму поліпептидному ланцюзі.

6.3. Кореляційні зв'язки між досліджуваними ензимами

Досліджувані захисні ензими спостерігалися у всіх органах *M. galloprovincialis*. При цьому кожний орган відрізнявся рівнем активності ензимів та набором молекулярних форм.

Гепатопанкреас, крім участі у процесі перетравлення їжі, виконує різноманітні захисні функції. У цьому органі активно знищуються супероксидні радикали. Надлишок пероксидів, що виникає внаслідок активності супероксиддисмутази, ліквідується у гепатопанкреасі головним чином за допомогою каталази та глутатіонпероксидази. Гепатопанкреас, судячи з активності глутатіон-S трансферази та естераз, виконує головну роль у нейтралізації ксенобіотиків.

Ктенідії не тільки забезпечують дихання молюсків і виведення CO_2 – процес, що виконує карбоангідраза. Глутатіонредуктаза ктенідій, яка має другий у порівнянні з іншими органами рівень активності, сприяє збереженню відновлювального потенціалу організму молюска. Значна активність пероксиредоксинів та фероксидази свідчить про важливу роль цього органу у нейтралізації АФК.

Мантія, окрім того, що є фізичним захисним бар'єром тіла двостулкових, виконує багато фізіолого-біохімічних функцій, що знаходить своє відображення у різноманітності ензиматичних спектрів. У мантії найвищий рівень активності пероксидази, пероксіредоксинів, НАДН- та НАДФН-оксидаз, глутатіонредуктази, амінооксидази, високоактивні також карбоангідраза, естерази, тобто ензими, що виконують багатогранні захисні та сигнальну функції.

Нога у мідій займає важливе місце в АОС, оскільки має високоактивну (друге місце) глутатіонпероксидазу. Аддуктор, який контролює стан стулоч мушлі, виконує антиоксидантну функцію за допомогою фероксидази (перше місце за активністю), глутатіонпероксидази (третє місце). Також приймає участь у антимікробному захисту (за активністю мієлопероксидази аддуктор займає друге місце серед досліджуваних органів). Можливо, допомагає мантії у формуванні мушлі. Цей орган має найактивнішу карбоангідразу.

Двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) показав (табл. 6.2), що досліджувані фактори як окремо («ензими», «органи»), так і разом («ензими-органи») мають статистично значимий вплив на показники активності в органах мідій ($F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$).

Таблиця 6.2

Дисперсійний аналіз експериментальних даних щодо активності захисних ензимів у досліджуваних органах мідій

Джерело варіації	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F-critical</i>	Доля впливу, %
Ензими	5163,66	12	430,31	9244,39	1,83	48
Органи	746,58	4	186,64	4009,73	2,44	7
Ензими-Органи	4878,58	48	101,64	2183,51	1,46	45
В межах	6,05	130	0,05	—	—	0
Всього	10794,87	194	—	—	—	100

Примітка. *SS* – сума квадратів, *df* – значення ступенів свободи, *MS* – значення дисперсії, *F* – значення F-статистики ($F_{\text{експ.}}$), *F-critical* – значення ймовірності ($F_{\text{табл.}}$).

На основі отриманих результатів ізо-алозимного аналізу в програмі Statistica 14.0 (TIBCO, США) було побудовано графік розподілу середніх значень активності досліджуваних ензимів антиоксидантної системи та біотрансформації ксенобіотиків у п'яти органах мідій (гепатопанкреас, ктенідії, мантия, нога, мускул-аддуктор), згрупованих за фактором впливу «ензими-органи» (рис. 6.13). На рис. 6.13 наглядно показано, що в гепатопанкреасі найвищу активність має супероксиддисмутаза, естерази та НАДФН-оксидаза, а найменшу – глутатіонредуктаза; у ктенідіях найвища активність пероксидази і НАДФН-оксидаза, найменша – глутатіонпероксидази і глутатіон-S трансферази; у мантиї найвища активність НАДН-оксидази, НАДФН-оксидази, естераз та пероксидази, найменша – глутатіон-S трансферази, каталази та глутатіонпероксидази; у нозі найвищу активність має супероксиддисмутаза, найменшу – глутатіон-S трансфераза і глутатіонредуктаза; в аддукторі найвища активність супероксиддисмутази, пероксидази та карбоангідрази, найменша – глутатіон-S трансферази, каталази та пероксиредоксиів. Різна активність ензимів у досліджуваних органах безумовно зв'язана з неоднаковим функціональним призначенням кожного органу.

Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що найбільше навантаження супероксидним радикалом зазнає гепатопанкреас та тканини ноги, найменше – ктенідії. Судячи з активності естераз, гепатопанкреас виконує головну функцію у нейтралізації ксенобіотиків. Високий рівень пероксидази в ктенідіях, яка може функціонувати як мієлопероксидаза, визначає значення цього органу у захисту від патогенних мікробів, що підтверджено іншими авторами (Livingstone, Pipe, 1992). Спостережувана висока активність НАДН-оксидази та НАДФН-оксидази у мантиї досліджуваних молюсків, можливо пов'язана зі значною енергетичною активністю цього органу у здійсненні різноманітних енергоємних процесів (Shcherbak et al., 1996).

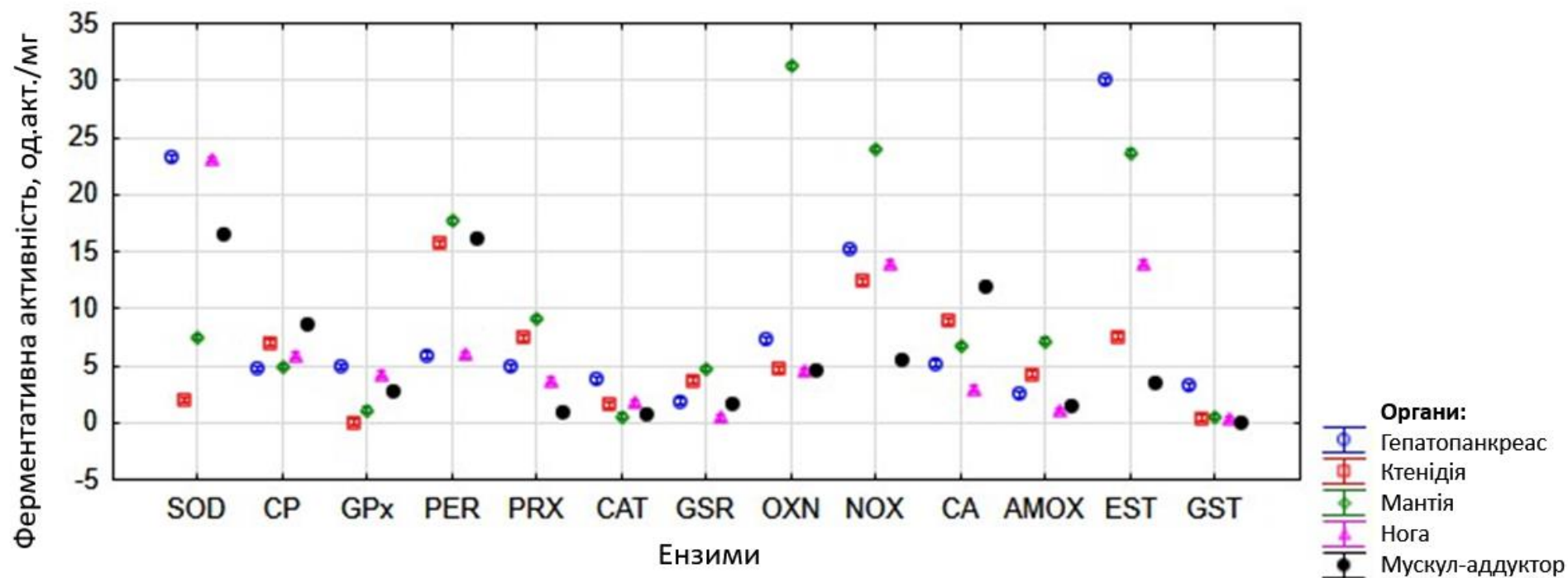


Рис. 6.13. Розподіл активності ензимів антиоксидантного стресу та біотрансформації ксенобіотиків у різних органах *M. galloprovincialis*. Скорочене позначення ензиму: SOD – супероксиддисмутаза; CP – фероксидаза; GPx – глутатіонпероксидаза; PER – пероксидаза; PRX – пероксиредоксини; CAT – каталаза; GSR – глутатіонредуктаза; OXN – НАДН-оксидаза; NOX – НАДФН-оксидаза; CA – карбоангідраза; AMOX – амінооксидаза; EST – естерази; GST – глутатіон-S трансфераза.

Оскільки будь-який живий організм є цілісною системою, важливо з'ясувати, як взаємодіють різні захисні ензими в усіх органах. Було проведено кореляційний аналіз за даними, отриманими для усіх органів.

Для проведення кореляційного аналізу, розраховану активність ензимів в кожному органі замінювали на ранги, ранжуючи при цьому органи від більшої до меншої активності відповідного ензиму. Критичний коефіцієнт кореляції рангів Спірмена для 5 корелюючих пар становить $r = 0,94$ при рівні достовірності $p = 0,05$. Результати аналізу представлені в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Кореляційні зв'язки між досліджуваними захисними ензимами

	GSR	GPx	PER	CAT	PRX	SOD	CP	OxN	NOx	GST	EST	AMOX
GSR												
GPx	-0,60											
PER	0,50	-0,70										
CAT	-0,50	0,70	-1,00									
PRX	0,90	-0,50	0,30	-0,30								
SOD	-0,60	1,00	-0,70	0,70	-0,50							
CP	-0,30	-0,50	0,40	-0,40	-0,50	-0,50						
OxN	0,90	-0,20	0,30	-0,30	0,80	-0,20	-0,60					
NOx	0,50	0,20	0,00	0,00	0,70	0,20	-0,90	0,70				
GST	0,30	0,50	-0,40	0,40	0,50	0,50	-1,00	0,60	0,90			
EST	0,30	0,50	-0,40	0,40	0,50	0,50	-1,00	0,60	0,90	1,00		
AMOX	1,00	-0,60	0,50	-0,50	0,90	-0,60	-0,30	0,90	0,50	0,30	0,30	
CA	0,30	-0,60	0,60	-0,60	-0,10	-0,60	0,70	0,10	-0,60	-0,70	-0,70	0,30

Примітка. Критичний коефіцієнт рангової кореляції Спірмена для $n = 5$ становить $r = 0,94$ на рівні достовірності $p = 0,05$. Жирним шрифтом позначені достовірні значення коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена. Скорочене позначення ензиму: GSR – глутатіонредуктаза; GPx – глутатіонпероксидаза; PER – пероксидаза; CAT – каталаза; PRX – пероксиредоксини; SOD – супероксиддисмутаза; CP – фероксидаза; OxN – НАДН-оксидаза; NOx – НАДФН-оксидаза; GST – глутатіон-S трансфераза; EST – естерази; AMOX – амінооксидаза; CA – карбоангідраза.

Як видно з табл. 6.3, каталаза (CAT) конкурує з пероксидазою (PER) за субстрат – пероксид водню. У гепатопанкреасі каталаза просто руйнує пероксид, який утворюється за рахунок високої активності супероксиддисмутази (SOD). У ктенідіях, мантиї та аддукторі цей субстрат, очевидно, використовується в основному для боротьби з мікроорганізмами.

За результатами кореляційного аналізу активність глутатіонредуктази (GSR) у досліджуваних тканинах мідій позитивно корелює ($r = 0,90$) з активністю пероксиредоксинів (PRX), які відновлюються за участю глутатіону. Висока кореляція між активністю SOD і активністю глутатіонпероксидази (GPx) вказує на те, що надлишок пероксидів (спричинений супероксиддисмутазою) ліквідується з усього тіла мідії насамперед глутатіонпероксидазою, а не каталазою, як у гепатопанкреасі. Результати позитивної кореляції між цими ензимами в різних органах також були показані в дослідженнях (Кузьміна та ін., 2008).

Позитивну кореляцію між активністю НАДН-оксидази (OXN) і активністю глутатіонредуктази (GSR) можна пояснити необхідністю відновлення глутатіону, який витрачається на нейтралізацію АФК, що виникають при функціонуванні OXN. Аналогічним чином амінооксидаза (AMOX), яка виявляє прооксидантну активність, може бути пов'язана з PRX, OXN та GSR. Крім того, AMOX може бути джерелом токсичного формальдегіду, одним із шляхів нейтралізації якого є використання відновленого глутатіону (Yanovych, Yanovych, 2011). Відомо, що внутрішньоклітинний пул останнього підтримує GSR.

Для фероксидази (CP) характерні взаємовідносини з різними за функцією ензимами. Можливо, фероксидаза, як ензим, що відповідає за баланс міді та заліза в організмі, впливає на активність NOX. Фероксидаза з глутатіон-S трансферазою (GST), НАДФН-оксидазою (NOX) і естеразою (EST) бере участь у знешкодженні АФК і ксенобіотиків. Але важко зрозуміти, чому їхня координація конкурентна. Це може бути пов'язано зі складним і неоднозначним взаємозв'язком між цими ензимами і різною внутрішньоклітинної локалізацією. GST, EST і NOX тісно та скоординовано взаємодіють для нейтралізації ксенобіотиків.

6.4. Диференціація *M. galloprovincialis* за допомогою біохімічних маркерів

У роботі розглядали питання щодо можливого використання досліджуваних ензимів для генетичної диференціації угруповань мідій. З цією метою аналізували ізо-алозимні спектри звертаючи увагу на поліморфізм і тканниний розподіл 13 захисних ензимів в п'яти органах мідій з ПЗЧМ. Згідно даних представлених у попередньому підрозділі на наш погляд найбільш придатними для диференціювання угруповань мідій могли бути супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та естераза. Тому ми аналізували електрофоретичні спектри двох ензимів АОС (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза) та одного ензиму біотрансформації ксенобіотиків (естераза) у індивідуальних особин мідій.

Електрофоретичні спектри супероксиддисмутази особин *M. galloprovincialis* з локації А та В представлено на рис. 6.14.

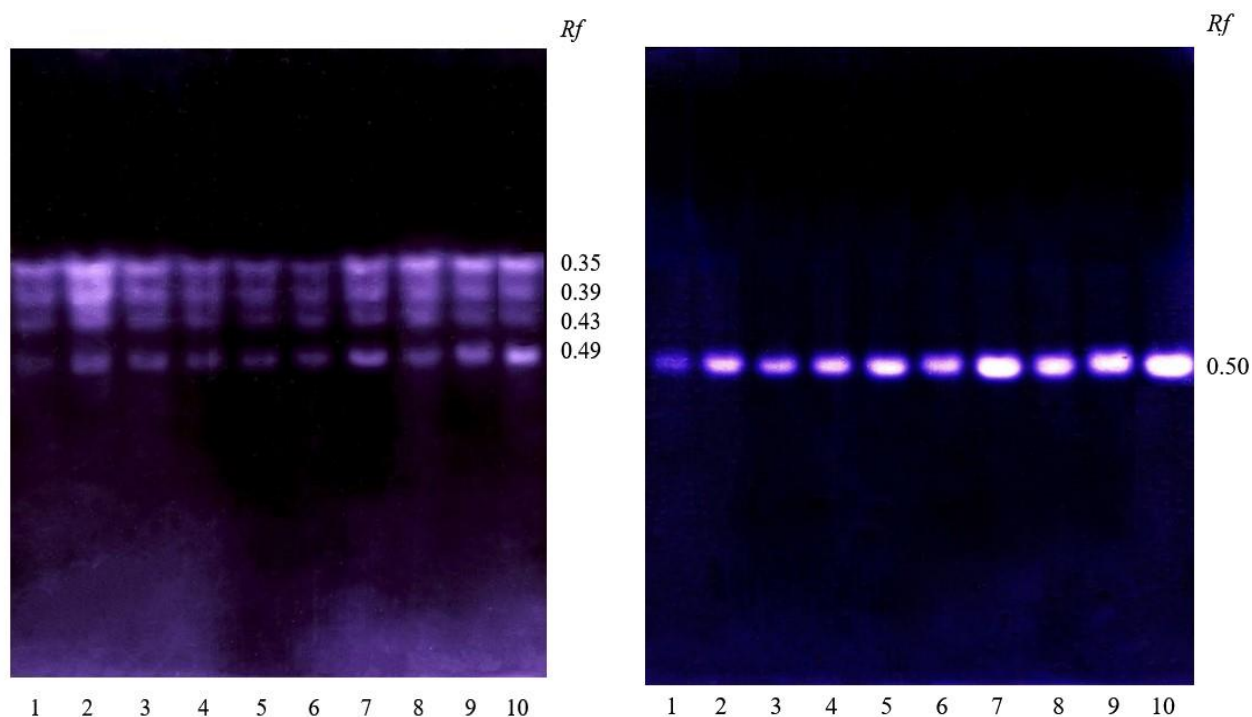


Рис. 6.14. Електрофоретичні спектри супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази активностей в гепатопанкреасі індивідуальних особин *M. galloprovincialis* з північно-західної частини Чорного моря: 1-5 – з локації А, 6-10 – з локації В. *Rf* – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

На представлених електрофореграмах виявлено чотири ММФ супероксиддисмутази та одну ММФ глутатіонпероксидази в гепатопанкреасі. Електрофоретична рухливість ММФ супероксиддисмутази знаходилася в діапазоні від 0,35 до 0,49. Глутатіонпероксидаза характеризувалася молекулярною формою Rf 0,50, яка була виявлена у всіх досліджуваних мідій. Крім того, в глутатіонпероксидази спостерігалася наявність мінорних множинних форм над ММФ Rf 0,50, які були виражені не досить чітко і тому не бралися до уваги.

Виявлені ММФ у особин мідій характеризувалися різною інтенсивністю забарвлення, але поліморфізму за різною електрофоретичною рухливістю у індивідуальних особин не спостережали. Визначили, що молекулярні форми супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази виявилися не поліморфними серед досліджених особин мідій і тому не можуть бути запропоновані для диференціації угруповань мідій з різних локацій. Відмінності у спектрах цих ензимів появлялися в інтенсивності забарвлення смуг, що свідчить про неоднакову активність та різний вміст ММФ в екстрактах гепатопанкреасу досліджуваних молюсків.

Для ензиму біотрансформації ксенобіотиків – естерази, вдалося розрізнити до 7 ММФ, які були виявлені в діапазоні Rf від 0,11 до 0,31 (рис. 6.15). Слід зазначити, що на електрофореграмі представлені α -естерази (темно-коричневі смуги) та β -естерази (червоні смуги). Можна припустити, що на отриманій електрофореграмі кількість ММФ β -естераз є більше ніж кількість ММФ α -естераз. Точно розрізнити колір забарвлення виявилось складно, тому проводився загальний аналіз спектрів, без розділення на типи.

Найбільш консервативними для естерази є смуги Rf 0,11 і 0,19. Вони зустрічалися у всіх досліджуваних особин мідій, але мали різну інтенсивність забарвлення. В діапазоні Rf від 0,27 до 0,31 ми спостерігали наявність поліморфізму, який проявлявся в наявності чи відсутності деяких смуг, та високу інтенсивність забарвлення виявлених смуг. Локація А в цьому діапазоні характеризувалася наявність трьох ММФ (Rf 0,28, 0,29, 0,31), а локація В – чотирьох ММФ (Rf 0,27, 0,29, 0,30, 0,31).

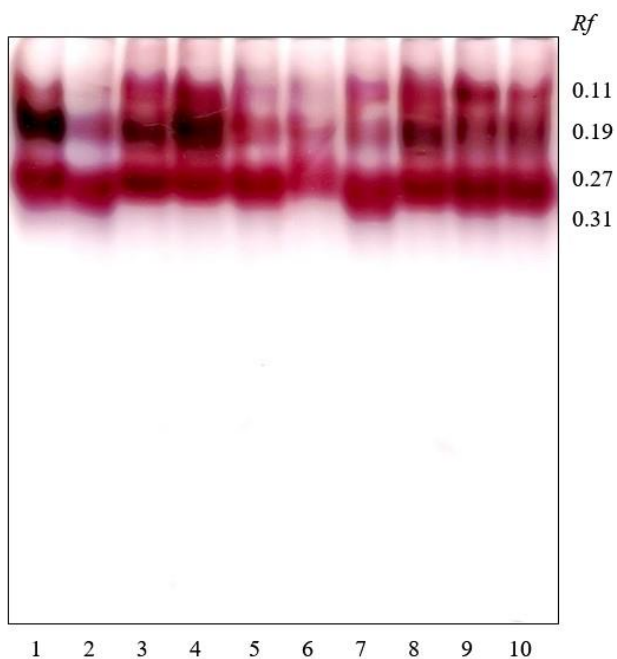


Рис. 6.15. Електрофоретичні спектри естеразної активностей в гепатопанкреасі індивідуальних особин *M. galloprovincialis* з північно-західної частини Чорного моря: 1-5 – з локації А, 6-10 – з локації В. R_f – відносна електрофоретична рухливість досліджуваного ензиму.

Згідно отриманих результатів можна зробити припущення, що в спектрі множинних форм естераз існує індивідуальна варіабельність, проте виникають складнощі при інтерпретації цих спектрів, тому подальше використання з метою диференціації угруповань мідій не було би раціональним.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На основі даних молекулярно-генетичного аналізу, проведеного з метою генетичної ідентифікації виду чорноморських мідій та перевірки гіпотези про наявність морфотипів, виникших за рахунок гібридизації мідій різних видів, серед досліджених моллюсків (171 особина) показано відсутність поліморфізму за геном адгезивного білка, зокрема, за сайтом, що фланкується комбінацією праймерів *Me 15 / Me 16*. Таким чином, було доведено, що досліджені угруповання мідій з шести локацій (А, В, С, D, Е, F) ПЗЧМ складаються виключно з особин *M. galloprovincialis*. Їх генотипи є гомозиготними за геном адгезивного білка і характеризуються алелем 126 п.н. Зазначимо, що отримані результати не підтверджують присутність мідій виду *M. trossulus* і *M. edulis* та їх гібридів з *M. galloprovincialis* у ПЗЧМ. Проте, нашими дослідженнями підтверджено наявність гібридизації між видами *M. trossulus* і *M. edulis* у Балтійському морі, *M. edulis* і *M. galloprovincialis* у Північному та Ватовому морях.

У межах «варіабельної області» гена *Fp1* адгезивного білка проведено філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей наступних видів мідій: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californianus* та *M. coruscus*, який свідчить про спостерігаєму мінливість на нуклеотидному рівні у представників роду *Mytilus* з окремих популяцій. За результатами біоінформатичного аналізу було визначено молекулярну масу та побудовано модель просторової структури адгезивного білка ноги *MeFr-1*, що кодується *Fp1* геном, для виду *M. galloprovincialis*.

За допомогою МС-аналізу було досліджено генетичне різноманіття та популяційну структуру угруповань мідії ПЗЧМ, а також Балтійського, Північного та Ватового морів. За чотирма поліморфними МС-локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) було ідентифіковано 64 алельних варіантів (діапазон: від 3 до 14) для 9 досліджуваних угруповань мідій ($n = 188$).

Дані спостережуваної та очікуваної гетерозиготності, а також індекси фіксації свідчили про дефіцит гетерозигот у досліджуваних угрупованнях мідій. За коефіцієнтом інбридингу субпопуляції відносно всієї загальної популяції між угрупованнями мідій з ПЗЧМ, а також між усіма досліджуваними вибірками мідій було встановлено слабку та середню генетичну диференціацію.

МС-маркери, які були застосовані для дослідження 9 вибірок мідій з різних локацій, виявили 14 однакових алелів. Одночасно в угрупованнях мідій з ПЗЧМ зустрічались 8 алелів, які не спостерігались у досліджених угруповань мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів. Між угрупованнями чорноморських мідій спостерігали більшу генетичну подібність, ніж між мідіями Балтійського, Північного та Ватового морів.

Показано, що за частотами алелів МС-локусів досліджені угруповання Балтійського, Північного та Ватового морів відрізняються від угруповань мідій з ПЗЧМ. За результатами кластерного і координатного аналізів, які проведено з урахуванням частот алелів МС-локусів, наглядно доведено більшу спорідненість угруповань мідій ПЗЧМ, у порівнянні з угрупованнями мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів.

За результатами аналізу генотипового поліморфізму за чотирма МС-локусами (*Mch 5*, *Mch 8*, *MT 203*, *MT 282*) у 188 особин мідій з 9 досліджуваних угруповань було визначено 139 генотипових варіантів. Встановлено, що найбільш поширеними за досліджуваними МС-локусами серед проаналізованих особин мідій є гомозиготні генотипи. За кількістю виявлених генотипових варіантів та унікальних генотипів, за допомогою мікросателітного аналізу, досліджувані угруповання мідій з шести локацій ПЗЧМ (А, В, С, D, Е, F) відрізнялися між собою та від угруповань мідій з Балтійського (локація G), Північного (локація H) та Ватового (локація J) морів.

За допомогою ізо-алозимного аналізу показано тканинний розподіл захисних ензимних систем та їх поліморфізм. Координовану діяльність цих систем в органах-мішенях мідії показано за допомогою кореляційного аналізу за

методом рангової кореляції Спірмена. Факторним аналізом виявлено суттєвий вплив досліджуваних факторів («ензими», «органи» та «ензими-органи») на ферментативну активність в органах мідій. Найбільшу кількість множинних форм ензимів було виявлено за дослідженням пероксидазної активності (до 11 форм), активності НАДФН-оксидази (до 8 форм) та активності естерази (до 8 форм). Найменшу кількість множинних форм ензимів (до двох форм) характеризували активність: глутатіонпероксидази та глутатіон-S трансферази. Одним із пояснень наявності множинних форм, які ми розкрили в роботі, може бути експресія кількох генних локусів, які часто змінюються в процесі розвитку організму, а іноді є тканиноспецифічними, тому, електрофоретичні спектри ензимів можуть відрізнятися в залежності від тканини та стадії розвитку організму.

Наведені в роботі результати свідчать на користь використання саме ДНК маркерів (гену адгезивного білка) і мікросателітів для вирішення питань видової належності мідій ПЗМЧ й можливості диференціації субпопуляцій або угруповань мідій з різних локацій.

ВИСНОВКИ

1. За даними молекулярно-генетичного аналізу з використанням діагностичного маркера *Me 15-16* у шести досліджуваних локаціях (А, В, С, D, Е, F) ПЗЧМ встановлено присутність тільки особин виду *Mytilus galloprovincialis* ($n = 171$).
2. Отримані результати генетичного аналізу не підтверджують присутність мідій видів *M. trossulus* і *M. edulis* та їх гібридів з *M. galloprovincialis* в ПЗЧМ.
3. У виборках мідій з Балтійського, Північного та Ватового морів за допомогою ПЛР-аналізу з діагностичним маркером *Me 15-16* виявлено *M. edulis* ($n = 26$), *M. trossulus* ($n = 1$) та їх гібриди ($n = 11$) у Балтійському морі; *M. edulis* ($n = 18$), *M. galloprovincialis* ($n = 1$) та їх гібрид у Північному морі; *M. edulis* ($n = 13$) та одного гібрида *M. galloprovincialis* × *M. edulis* у Ватовому морі.
4. Досліджувані нуклеотидні послідовності шести представників роду *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californianus*, *M. coruscus*), у межах «варіабельної області» гена *Fp1* адгезивного білка, відрізняються у різних видів мідій наявністю делецій: 54 п.н. – *M. galloprovincialis* і *M. chilensis*, 6 п.н. і 18 п.н. – *M. trossulus*, 12 п.н. – *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis*, а також наявністю ряду одонуклеотидних поліморфізмів.
5. За результатами мікросателітного аналізу угруповань мідій з різних локацій ПЗЧМ спостерігали високий рівень генетичного поліморфізму, але показано, що спостережувана гетерозиготність нижче очікуваної, що свідчить про можливий інбридинг або наявність нуля алеля.
6. Результати генетичної диференціації, отримані за МС-локусами, виявилися достатніми для виділення внутрішньовидових генетичних груп в

досліджуваних локаціях ПЗЧМ, які розглядаємо як одну популяцію чорноморської мідії.

7. Найбільшу кількість молекулярних форм ензимів у *Mytilus galloprovincialis* було виявлено для пероксидази (до 11 форм), НАДФН-оксидази (до 8 форм) та естерази (до 8 форм). Найменшою кількістю множинних форм ензимів (до 2 форм) характеризувалися: глутатіонпероксидаза та глутатіон S-трансфераза.
8. Відмічено кореляційні зв'язки між активністю досліджуваних ензимів: каталази з пероксидазою ($r = -1,00$); глутатіонредуктази з пероксиредоксинами ($r = 0,90$); супероксиддисмутази з глутатіонпероксидазою ($r = 1,00$); НАДН-оксидази з глутатіонредуктазою ($r = 0,90$); амінооксидази з пероксиредоксинами ($r = 0,90$), НАДН-оксидазою ($r = 0,90$), глутатіонредуктазою ($r = 1,00$); НАДФН-оксидази, глутатіон S-трансферази та естераз із фероксидазою ($r = -0,90$, $r = -1,00$, $r = -1,00$).
9. Досліджені ензими, як біохімічні маркери не можуть бути рекомендовані для диференціації угруповань мідій у зв'язку зі складністю спектрів, варіюванням спектрів характерних для різних органів і кількісними різницями в активності молекулярних форм ензимів, тому для генетичної диференціації краще застосовувати ДНК-маркери (варіабельну ділянку гена адгезивного білка та мікросателітні локуси).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Александров Б. та ін. Секрети Чорного моря. Київ, 2020. 63 с. URL: <https://emblasproject.org/wp-content/uploads/2021/07/Секрети-Чорного-моря.pdf> (дата звернення: 02.09.2023).
2. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології. Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
3. Гоженко А. І., Андрейцова Н. І., Квасницька О. Б. Біотрансформація екзогенних окисників в організмі людини та тварин. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2009. № 4 (18). С. 8-18.
4. Даниленко Л. І. Курс за вибором «Генетика людини з основами медичної генетики: методика викладання». Черкаси: Видавництво «ЧОПОПП ЧОР», 2017. 187 с.
5. Єршова О. Н., Топтіков В. А., Терлецька Я. О., Лавренюк Т. І., Каракис С. Г., Ковтун О. О. Антиоксидантна активність тканин *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) з акваторій північно-західної частини Чорного моря. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2014. Т. 19, вип. 2 (35). С. 9-17.
6. Золотарев В. Н. Склерохронология морских двустворчатых моллюсков. К.: Наукова думка, 1989. 107 с.
7. Золотарев В. Н., Шурова Н. М. Соотношение призматического и перламутрового слоев в раковинах мидий *Mytilus trossulus*. *Биология моря*. 1997. Т. 23, № 1. С. 26-30.
8. Климчук В. О. Математичні методи у психології. Навчальний посібник для студентів психологічних спеціальностей. К.: Освіта України, 2009. 288 с.
9. Красота Л. Л. Оцінка якості навколишнього середовища північно-західної частини Чорного моря за результатами біотестування вод у 2008-2014 рр. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спецвипуск: Гідроекологія*. 2015. Т. 64, № 3-4. С. 358-361.

10. Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д., Влізло В. В. Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів. *Біологія тварин*. 2008. Т. 10, № 1-2. С. 128-132.
11. Посібник користувача GelAnalyzer 19.1. URL: <http://www.gelanalyzer.com/gelanalyzer-19.1-user-manual.pdf?i=1> (дата звернення: 29.01.2021).
12. Рыбалка Д. Г., Поджарский М. А. АНАИС – Анализатор изображений спектров. 2004. URL: http://kazus.ru/programs/viewdownloadetails/kz_0/lid_2194.html (дата звернення: 10.05.2022).
13. Стадниченко С. В., Шурова Н. М., Золотарев В. Н. Пространственно-временные изменения популяции мидий *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 в северо-западной части Черного моря. *Биоразнообразие и роль животных в экосистемах*: материалы VII Междунар. науч. конференции. Днепропетровск: Адверта, 2013. С. 68-70.
14. Стадніченко С. В. Морфологічні особливості *trossulus*-подібних мідій Чорного моря. *Фауна України на межі ХХ-ХХІ ст. Стан і біорізноманіття екосистем природоохоронних територій*: матеріали міжнар. зоол. конф., присвяч. 220 річниці від дня народж. О. Завадського. Львів – смт. Шацьк, 12-15 вересня 2019 р. Львів: СПОЛОМ, 2019. С. 153-155.
15. Топтіков В. А., Єршова О. М., Ковтун О. О., Лавренюк Т. І., Тоцький В. М. Генетико-біохімічні дослідження адаптивності тварин та їх угруповань: навчально-методичний посібник. Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2017. 140 с.
16. Шурова Н. М. Структурна-функціональна організація популяції мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. Севастополь, 2009. 32 с.
17. Шурова Н. М. Структурно-функциональная организация популяций мидий *Mytilus galloprovincialis* Черного моря: монография. К.: Наукова думка, 2013. 208 с.

18. Шурова Н. М., Золотарьов В. М. Аналіз фенотипічної структури поселень мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря по кольору зовнішнього призматичного шару їх раковин. *Морський екологічний журнал*. 2008. Т. 7, №4. С. 88-97.
19. Щербак Г. Й., Царичкова Д. Б., Вервес Ю. Г. Зоологія безхребетних. Підручник: у трьох книгах. Книга 2. К.: Либідь, 1996. 320 с.
20. Янович Д. О., Янович Н. Є. Біотрансформація ксенобіотиків і механізми її регуляції. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького*. 2011. Т. 13, № 2(2). С. 305-311.
21. Abbadì M., Marciano S., Tosi F., De Battisti C., Panzarin V. et al. Species identification of bivalve molluscs by pyrosequencing. *J. Sci. Food Agric*. 2017. Vol. 97. P. 512-519.
22. Albig W., Warthorst U., Drabent B., Prats E., Cornudella L., Doenecke D. *Mytilus edulis* core histone genes are organized in two clusters devoid of linker histone genes. *J. Mol. Evol*. 2003. Vol. 56. P. 597-606.
23. Alexandrov B., Boltachev A., Kharchenko T., Lyashenko A., Son M. et al. Trends of aquatic alien species invasions in Ukraine. *Aquatic Invasions*. 2007. Vol. 2 (3). P. 215-242.
24. Alfonso-Prieto M., Biarnés X., Vidossich P., Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J. Am. Chem. Soc*. 2009. Vol. 131(33). P. 11751-11761.
25. Alves de Almeida E., Celso Dias Bairy A., Paula de Melo Loureiro A., Regina Martinez G., Miyamoto S. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol*. 2007. Vol. 146(4). P. 588-600.
26. Astorga M. P., Cardenas L., Vargas J. Phylogenetic Approaches to Delimit Genetic Lineages of the *Mytilus* Complex of South America: How Many Species are there? *J. Shellfish Res*. 2015. Vol. 34. P. 919-930.

27. Avise J. C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.* 1991. Vol. 25, P. 45-69.
28. Bach A. W., Lan N. C., Johnson D. L., Abell C. W., Bembenek M. E. et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *PNAS or PNAS USA.* 1988. Vol. 85(13). P. 4934-4938.
29. Bakhmet I. N., Sazhin A., Maximovich N., Ekimov D. In situ long-term monitoring of cardiac activity of two bivalve species from the White Sea, the blue mussel *Mytilus edulis* and horse mussel *Modiolus modiolus*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 2019. Vol. 99(4). P. 833-840.
30. Bandara N., Zeng H., Wu J. Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics. *J. Adhes. Sci. Technol.* 2013. Vol. 27(18-19). P. 2139-2162.
31. Bannister J. V., Bannister W. H., Hill H. A. O., Mahood J. F., Willson R. L., Wolfenden B. S. Does caeruloplasmin dismutase superoxide? No. *FEBS Lett.* 1980. Vol. 118(1). P. 127-129.
32. Barrett A. J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997). *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 250(1). P. 1-6.
33. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 2009. Vol. 77. P. 1303-1315.
34. Beaumont A. R. Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol. J. Linn. Soc.* 1991. Vol. 44. P. 273-285.
35. Beaumont A. R., Hawkins M. P., Doig F. L., Davies I. M., Snow M. Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008. Vol. 367. Vol. 100-110.

36. Beaumont A. R., Seed R., Garcia-Martinez P. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Proc. 23rd Eur. Mar. Biol. Symp.* 1989. P. 251-258.
37. Berg P. R., Star B., Pampoulie C., Sodeland M., Barth J. M. I. et al. Three chromosomal rearrangements promote genomic divergence between migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. Art. 23246.
38. Bertucci A., Moya A., Tambutte S., Allemand D., Supuran C. T., Zoccola D. Carbonic anhydrases in anthozoan corals – a review. *Bioorg Med Chem.* 2013. Vol. 21. P. 1437-1450.
39. Bierne N., Borsa P., Daguin C., Jollivet D., Viard F. et al. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mol. Ecol.* 2003. Vol. 2(2). P. 447-611.
40. Bierne N., David P., Boudry P., Bonhomme F. Assortative fertilization and selection at larval stage in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Evolution.* 2002. Vol. 56. P. 292-298.
41. Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics.* 1998. Vol. 148. P. 1893-1906.
42. Birky C. W. Uniparental inheritance of mitochondrial & chloroplast genes: mechanism & evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 11331-11338.
43. Blaschko H., Hawkins J. Observations on amine oxidase in cephalopods. *J. Physiol.* 1952. Vol. 118(1). P. 88-93.
44. Boss K. J. Critical estimate of the number of recent Mollusca. *Occasional Papers on Mollusks.* 1971. Vol. 3. P. 81-135.
45. Boukadida K., Mlouka R., Clerandeanu C., Banni M., Cachot J. Natural distribution of pure and hybrid *Mytilus* sp. along the south Mediterranean and North-east Atlantic coasts and sensitivity of D-larvae stages to temperature increases and metal pollution. *Sci. Total Environ.* 2021. Vol. 756. Art. 143675.

46. Brito A. F., Braconi C. T., Weidmann M., Dilcher M., Alves J. M., Gruber A., Zanotto P. M. The Pangenome of the *Anticarsia gemmatalis* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Genome Biol. Evol.* 2015. Vol. 8(1). P. 94-108.
47. Brown A. H. D., Weir B. S. Measuring genetic variability in plant populations. *Isozymes: in Plant Genetics and Breeding*, Part A. Ed. by Tanksley S. D., Orton T. J. 1983. P. 219-239.
48. Bulnheim H. P., Gosling E. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea Helgol. *Meeresunters.* 1988. Vol. 42. P. 113-129.
49. Buth D. G. Genetic principles and the interpretation of electrophoretic data. In: *Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management* / Whitmore D. H., ed. CRC Press, Boca Raton. 1990. P. 1-21.
50. Calcino A. D., Kenny N. J., Gerdol M. Single individual structural variant detection uncovers widespread hemizyosity in molluscs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2021. Vol. 376. Art. 20200153.
51. Chapman A. D. Numbers of living species in Australia and the world. 2nd Edition. Canberra: Australian Biological Resources Study, 2009. 80 p.
52. Chen X., Li R., Wang C., Mu C., Song W. et al. An effective method for identification of three mussel species and their hybrids based on SNPs. *Conserv. Genet. Resour.* 2020. Vol. 12. P. 5-8.
53. Cong R., Sun W., Liu G., Fan T. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunol.* 2005. Vol. 18(1). P. 61-70.
54. Coolen J. W. P., Boon A. R., Crooijmans R., van Pelt H., Kleissen F. et al. Marine stepping-stones: connectivity of *Mytilus edulis* populations between offshore energy installations. *Mol. Ecol.* 2020. Vol. 29(4). P. 686-703.
55. Corrochano-Fraile A., Davie A., Carboni S., Bekaert M. Evidence of multiple genome duplication events in *Mytilus* evolution. *BMC Genomics.* 2022. Vol. 23(1). Art. 340.

56. Daniels E. Q., Litvaitis M. K. Does peripheral dislodgement contribute to heterozygote deficiencies in blue mussels? *Invertebr. Biol.* 2017. Vol. 136(3). P. 301-308.
57. Davis B. I. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121(2). P. 404-427.
58. De Oliveira F. K., Santos L. O., Buffon J. G. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Res. Int.* 2021. Vol. 143. Art. 110266.
59. DeMartini D. G., Errico J. M., Sjoestroem S., Fenster A., Waite H. A cohort of new adhesive proteins identified from transcriptomic analysis of mussel foot glands. *J. R. Soc. Interface.* 2017. Vol. 14(131). Art. 20170151.
60. Despio P. F. M. Evaluación genética del chorito *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854), en base a su distribución batimétrica en los bancos naturales del estuario Reloncaví, región de Los Lagos. PhD thesis, Instituto de Acuicultura, Puerto Montt Chile. 2016. 69 p.
61. Drabent B., Kim J. S., Albig W., Prats E., Cornudella L., Doenecke D. *Mytilus edulis* histone gene clusters containing only H1 genes. *J. Mol. Evol.* 1999. Vol. 49. P. 645-655.
62. Edmondson D. E., Binda C., Mattevi A. The FAD binding sites of human monoamine oxidases A and B. *Neurotoxicol.* 2004. Vol. 25(1-2). P. 63-72.
63. Eirín-López J. M., González-Tizón A. M., Martínez A., Méndez J. Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus* spp): possible evidence of an “orphan origin” for H1 histone genes. *J. Mol. Evol.* 2002. Vol. 55. P. 272-283.
64. Eirín-López J. M., Ruiz M. F., González-Tizón A. M., Martínez A., Sánchez L., Méndez J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of a five histone genes containing an H1 subtype whit “orphan” features. *J. Mol. Evol.* 2004. Vol. 58. P. 131-144.

65. Faucet J., Maurice M., Gagnaire B., Renault T., Burgeot T. Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science*. 2004. Vol. 25(3-4). P. 177-184.
66. Fernández C., San Miguel E., Fernández-Briera A. Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived species *Margaritifera*. *Biol. Res*. 2009. Vol. 42(1). P. 57-68.
67. Fernández-Tajes J., Longa A., García-Gil J., Chiu Y. W., Huang Y. S. et al. Alternative PCR–RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *Eur. Food Res. Technol*. 2011. Vol. 233(5). P. 791-796.
68. Filpula D. R., Lee S. M., Link R. P., Strausberg S. L., Strausberg R. L. Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Pritg*. 1990. Vol. 6. P. 171-177.
69. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol*. 2011. Vol. 194. P. 7-15.
70. Food and Agricultural Organization (FAO). FAO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics 2019. Aquaculture Production. Rome: FAO, 2021. 110 p.
71. Food and Agriculture Organization (FAO). State of World Fisheries and Aquaculture: 2016. Food & Agriculture Organization, 2016. 200 p.
72. Food and Agriculture Organization (FAO). Statistical Yearbook 2020. Food & Agriculture Organization of the United Nations, 2021. 363 p.
73. Forooshani P. K., Lee B. P. Recent approaches in designing bio-adhesive materials inspired by mussel adhesive protein. *Poly. Chem*. 2016. Vol. 55. P. 9-33.
74. Fraïsse C., Belkhir K., Welch J. J., Bierne N. Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Mol. Ecol*. 2016. Vol. 25(1). P. 269-286.
75. Gaitán-Espitia J. D., Quintero-Galvis J. F., Mesas A., D'Elia G. Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Sci. Res*. 2016. Vol. 6. Art. 26853.

76. Gallardo-Escárate C., Valenzuela-Muñoz V., Nuñez-Acuña G., Valenzuela-Miranda D., Tapia F. J. et al. Chromosome-Level Genome Assembly of the Blue Mussel *Mytilus chilensis* Reveals Molecular Signatures Facing the Marine Environment. *Genes (Basel)*. 2023. Vol. 14(4). Art. 876.
77. Gao X. G., Li H. J., Li Y. F., Sui L. J., Zhu B. et al. Sixteen polymorphic simplesequence repeat markers from expressed sequence tags of the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2010. Vol. 11(8). P. 3035-3038.
78. Gardeström J., Pereyra R. T., André C. Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conserv. Genet.* 2008. Vol. 9. P. 1003-1005.
79. Garrido-Ramos M. A., Stewert D. T., Sutherland B. W., Zouros E. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissue of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome*. 1998. Vol. 41(6). P. 818-824.
80. Geist J., Kuehn R. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14(2). P. 425-439.
81. Gérard K., Bierne N., Borsa P., Chenuil A., Féral J.-P. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2008. Vol. 49. P. 84-91.
82. Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M. G., Figueras A., Fiorito G. et al. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia. In: *Advances in Comparative Immunology* / Cooper E., eds. Cham: Springer, 2018. P. 225-341.
83. Gerdol M., Moreira R., Cruz F. et al. Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel. *Genome Biol.* 2020. Vol. 21. Art. 275.

84. Geret F., Manduzio H., Company R., Leboulenger F., Bebianno M. J., Danger J. M. Molecular cloning of superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from aquatic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 2004. Vol. 58(2-5). P. 619-623.
85. Giantsis I., Mucci N., Randi E., Abatzopoulos T., Apostolidis A. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in central and eastern Mediterranean: Genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *J. Mar. Biolog. Assoc. U. K.* 2014. Vol. 94(4). P. 797-809.
86. Gjedrem T., Rye M. Selection response in fish and shellfish: A review. *Rev. Aquac.* 2018. Vol. 10. P. 168-179.
87. Goldstein I. M., Kaplan H. B., Edelson H. S. Weissmann G. Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982. Vol. 389. P. 368-379.
88. Golicz A. A., Batley J., Edwards D. Towards plant pangenomics. *Plant Biotechnol. J.* 2016. Vol. 14. P. 1099-1105.
89. Gosling E. Marine bivalve molluscs. 2nd Edition. John Wiley and Sons, Ltd. 2015. 536 p.
90. Green A. Invasive Species Report: Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *International Union for Conservation of Nature*. 2014. 12 p.
91. Grimsby J., Lan N. C., Neve R., Chen K., Shih J. C. Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *J. Neurochem.* 1990. Vol. 55(4). P. 1166-1169.
92. Groenenberg D. S. J., Wesselingh F. P., Rajagopal S., Jansen J. M., Bos M. M. et al. On the identity of broad-shelled mussels (Mollusca, Bivalvia, *Mytilus*) from the Dutch delta region. *Contrib. Zool.* 2011. Vol. 80. P. 95-106.
93. Hamer B., Durmiši E., Nerlovic V., Bierne N. Recent taxonomic discoveries concerning the genus *Mytilus* in the Adriatic Sea. Implications for biomonitoring. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* 2013. Vol. 40. P. 772.
94. Hamilton J. S., Piria M., Gavrilović A., Mrkonjić F. M., Svečnjak L. et al. Limited population genetic variation but pronounced seascape genetic structuring in

- populations of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the eastern Adriatic Sea. *Ecol. Evol.* 2023. Vol. 13(1). Art. e9729.
95. Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Electr.* 2001. Vol. 4. P. 1-9.
 96. Harper E., Taylor J. D., Crame A. The evolutionary biology of the Bivalvia. Geological Society, London, 2000. 494 p.
 97. Harrang E., Lapègue S., Morga B., Bierne N. A high load of non-neutral amino-acid polymorphisms explains high protein diversity despite moderate effective population size in a marine bivalve with sweepstakes reproduction. *G3 (Bethesda)*. 2013. Vol. 3(2). P. 333-341.
 98. Hartl D. L., Clark A. G. Principles of Population Genetics. 3rd Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., 1997. 519 p.
 99. Haruyo Sugimoto, Yu-Dai Taguchi, Kiyotaka Shibata, Hiroyasu Kinemuchi Molecular characteristics of a single and novel form of carp (*Cyprinus carpio*) monoamine oxidase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 155(3). P. 266-271.
 100. Heath D. D., Rawson P. D., Hilbish T. J. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1995. Vol. 52. P. 2621-2627.
 101. Hedgecock D., Pudovkin A. I. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *Bull. Mar. Sci.* 2011. Vol. 87. P. 971-1002.
 102. Hedgecock D., Shin G., Gracey A. Y., Den Berg D. V., Samanta M. P. Second-generation linkage maps for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* reveal errors in assembly of genome scaffolds. *G3 (Bethesda)*. 2015. Vol. 5(10). P. 2007-2019.
 103. Hedrick P. W. Genetics of Populations. 2nd Edition. Boston: Jones and Bartlett, 2000. 553 p.

104. Hennebert E., Maldonado B., Ladurner P., Flammang P., Santos R. Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: a review. *Interface Focus*. 2015. Vol. 5. Art. 20140064.
105. Hilbish T. J., Mullinax A., Dolven S. I., Meyer A., Koehn R. K., Rawson P. D. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Mar. Biol.* 2000. Vol. 136. P. 69-77.
106. Hilbish T., Carson E., Plante J., Weaver L., Gilg M. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Mar. Biol.* 2002. Vol. 140(1). P. 137-142.
107. Hillis D. M., Bull J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol.* 1993. Vol. 42. P. 182-192.
108. Hollenbeck C. M., Johnston I. A. Genomic tools and selective breeding in molluscs. *Front. Genet.* 2018. Vol. 9. Art. 253.
109. Houston R. D., Bean T. P., Macqueen D. J., Gundappa M. K., Jin Y. H. et al. Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. *Nat. Rev. Genet.* 2020. Vol. 21. P. 389-409.
110. Huang Y.-S., Lin C.-Y., Cheng W.-C. Investigating the Transcriptomic and Expression Presence-Absence Variation Exist in Japanese Eel (*Anguilla japonica*), a Primitive Teleost. *Mar. Biotechnol. (N. Y.)*. 2021. Vol. 23(6). P. 943-954.
111. Huber M. Compendium of Bivalves. A FullColor Guide to 3'300 of the World's Marine Bivalves. A Status on Bivalvia after 250 Years of Research. Conch Books, Hackenheim, 2010. 901 p.
112. Ieyama H., Kameoka O., Tan T., Yamasaki J. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species of Mytilidae. *Venus*. 1994. Vol. 53. P. 327-331.
113. Ighodaro O. M., Akinloye O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their

- fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* 2018. Vol. 54. P. 287-293.
114. Inoue K., Odo S., Noda T., Nakao S., Takeyama S. et al. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Mar. Biol.* 1997. Vol. 128. P. 91-95.
115. Inoue K., Waite J. H., Matsuoka M., Odo S., Harayama S. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. *Biol. Bull.* 1995. Vol. 189(3). P. 370-375.
116. Jilberto F., Araneda C., Larraín M. A. High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species. *Food Chem.* 2017. Vol. 229. P. 716-720.
117. Kenney W. C. Molecular nature of isozymes. *Horiz. Biochem. Biophys.* 1974. Vol. 1. P. 38-61.
118. Kijewski T., Wijsman J. W. M., Hummel H., Wenne R. Genetic composition of cultured and wild mussels *Mytilus* from The Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture.* 2009. Vol. 287. P. 292-296.
119. Knöbel L., Nascimento-Schulze J. C., Sanders T., Zeus D., Hiebentha C. et al. Salinity driven selection and local adaptation in Baltic Sea Mytilid mussels. *Front. Mar. Sci.* 2021. Vol. 8. Art. 692078.
120. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002. Vol. 30(6). P. 620-650.
121. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35(6). P. 1547-1549.
122. Larraín M. A., Díaz N. F., Lamas C. et al. Heterologous microsatellite-based genetic diversity in blue mussel (*Mytilus chilensis*) and differentiation among localities in southern Chile. *LAJAR.* 2015. Vol. 43(5). P. 998-1010.

123. Larraín M. A., Diaz N. F., Lamas C., Vargas C., Araneda C. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2012. Vol. 40(4). P. 1077-1084.
124. Larraín M. A., González P., Pérez C., Araneda C. Comparison between single and multi-locus approaches for specimen identification in *Mytilus* mussels. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 1-13.
125. Larraín M. A., Zbawicka M., Araneda C., Gardner J. P. A., Wenne R. Native and invasive taxa on the Pacific coast of South America: Impacts on aquaculture, traceability and biodiversity of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Evol. Appl.* 2018. Vol. 11. P. 298-311.
126. Launey S., Hedgecock D. High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics.* 2001. Vol. 159. P. 255-265.
127. Le Roy N., Jackson D. J., Marie B., Ramos-Silva P., Marin F. Carbonic anhydrase and metazoan biocalcification: a focus on molluscs. *Key Eng. Mater.* 2016. Vol. 672. P. 151-157.
128. Leggat W., Dixon R., Saleh S., Yellowlees D. A novel carbonic anhydrase from the giant clam *Tridacna gigas* contains two carbonic anhydrase domains. *FEBS J.* 2005. Vol. 272. P. 3297-3305.
129. Levinton J. S., Lassen H. H. Selection, ecology and evolutionary adjustment within bivalve mollusc populations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1978. Vol. 284. P. 403-415.
130. Li R., Zhang W., Lu J., Zhang Z., Mu C. et al. The whole-genome sequencing and hybrid assembly of *Mytilus coruscus*. *Front. Genet.* 2020. Vol. 11. Art. 440.
131. Li X., Schuler M. A., Berenbaum M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann. Rev. Entomol.* 2007. Vol. 52. P. 231-253.
132. Liu J., Zhao M., Song W., Ma L., Li X. et al. An amine oxidase gene from mud crab, *Scylla paramamosain*, regulates the neurotransmitters serotonin and dopamine *in vitro*. *PLoS ONE.* 2018. Vol. 13(9). Art. e0204325.

133. Liu Z. J., Cordes J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 2004. Vol. 238. P. 1-37.
134. Livingstone D. R., Pipe R. K. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture* / Gosling E. M ed. 1992. P. 425-464.
135. Lojda Z. The demonstration of myeloperoxidase in paraffin sections with a new method. *Cs. Patol.* 1967. Vol. 3. P. 31-33.
136. Lourenço C. R., Nicastro K. R., Serrão E. A., Castilho R., Zardi G. I. Behind the mask: cryptic genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* along southern European and northern African shores. *J. Molluscan Stud.* 2015. Vol. 81(3). P. 380-387.
137. Lushchak V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 101(1). P. 13-30.
138. Lyubas A. A., Tomilova A. A., Kondakov A. V., Konopleva E. S., Vikhrev I. V. et al. Phylogeography and Genetic Diversity of Duck Mussel *Anodonta anatine* (Bivalvia: Unionidae) in Eurasia. *Diversity*. 2023. Vol. 15(2). Art. 260.
139. Madeira F., Park Y., Lee J., Buso N., Gur T. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. P. 636-641.
140. Maier G. P., Rapp M. V., Waite J. H., Israelachvili J. N., Butler A. Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement. *Science*. 2015. Vol. 349(6248). P. 628-632.
141. Mallet A. Z., Zouros E., Gartner-Kepkay K. E., Freeman K. R., Dickie L. M. Larval viability and heterozygote deficiency in populations of marine bivalves: evidence from pair mating of mussels. *Mar. Biol.* 1985. Vol. 87(2). P. 165-172.
142. Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, 2003. 568 p.
143. Manduzio H., Monsinjon T., Galap C., Leboulenger F., Rocher B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a

- polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 2004. Vol. 70(1). P. 83-93.
144. Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* 2005. Vol. 20. P. 814-823.
145. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.
146. Manilo L., Snigirov S., Tkachenko P., Zamorov V. The Atlantic–Mediterranean fish assemblage and alien fishes in north-western part of the Black Sea within the waters of Ukraine. *GEO&BIO.* 2022. Vol. 22. P. 150-165. (In Ukrainian, with English summary).
147. Markert C. L., Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1959. Vol. 45(5). P. 753-763.
148. Marques A., Pilo D., Araujo O., Pereira F., Guilherme S. et al. Propensity to metal accumulation and oxidative stress responses of two benthic species (*Cerastoderma edule* and *Nephtys hombergii*): are tolerance processes limiting their responsiveness? *Ecotoxicol.* 2016. Vol. 25(4). P. 664-676.
149. Mathiesen S. S., Thyrring J., Hemmer-Hansen J., Berge J., Sukhotin A. et al. Genetic diversity and connectivity within *Mytilus* spp. in the subarctic and Arctic. *Evol. Appl.* 2017. Vol. 10. P. 39-55.
150. McCarthy C. G. P., Fitzpatrick D. A. Pan-genome analyses of model fungal species. *Microb. Genom.* 2019. Vol. 5. Art. e000243.
151. McCartney M. A., Auch B., Kono T., Mallez S., Zhang Y. et al. The genome of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: a resource for comparative genomics, invasion genetics, and biocontrol. *G3 (Bethesda).* 2022. Vol. 12(2). Art. jkab423.
152. McDonald J. H., Koehn R. K. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar Biol.* 1988. Vol. 99. P. 111-118.

153. McDonald J. H., Seed R., Koehn R. K Allozyme and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern hemispheres. *Mar. Biol.* 1991. Vol. 111. P. 323-335.
154. McInerney J., McNally A., O'Connell M. Why prokaryotes have pangenomes. *Nat. Microbiol.* 2017. Vol. 2. Art. 17040.
155. Medini D., Donati C., Tettelin H., Massignani V., Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. Vol. 15. P. 589-594.
156. Meijer A. E., Bloem J. H. Improved histochemical demonstration of carbonate dehydratase. *Acta Histochem. (Jena)*. 1966. Vol. 25. P. 239-241.
157. Meuwissen T. H. E., Hayes B. J., Goddard M. E. Prediction of Total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 2001. Vol. 157(4). P. 1819-1829.
158. Michalek K., Ventura A., Sanders T. *Mytilus* hybridisation and impact on aquaculture: A minireview. *Mar. Genomics*. 2016. Vol. 27. P. 3-4.
159. Mizi A., Zouros E., Moschonas N., Rodakis G. C. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 2005. Vol. 22(4). P. 952-967.
160. Moss D.W. Isoenzymes. Chapman & Hall Ltd., London, 1982. 204 p.
161. Murgarella M., Puiu D., Novoa B., Figueras A., Posada D., Canchaya C. A First Insight into the Genome of the Filter-Feeder Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*. 2016. Vol. 11(3). Art. e0151561.
162. Myrand B., Tremblay R., Sevigny J.-M. Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. *J. Hered.* 2002. Vol. 93(4). P. 238-248
163. Nascimento-Schulze J. C., Bean T. P., Houston R. D., Santos E. M., Sanders M. B. et al. Optimizing hatchery practices for genetic improvement of marine bivalves. *Rev. Aquac.* 2021. Vol. 13. P. 2289-2304.

164. Nascimento-Schulze J. C., Bean T. P., Peñaloza C., Paris J. R., Whiting J. R. et al. SNP discovery and genetic structure in blue mussel species using low coverage sequencing and a medium density 60 K SNP-array. *Evol. Appl.* 2023. Vol. 16(5). P. 1044-1060.
165. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979. Vol. 76. P. 5269-5273.
166. Nemoto M., Ren D., Herrera S., Pan S., Tamura T. et al. Integrated transcriptomic and proteomic analyses of a molecular mechanism of radular teeth biomineralization in *Cryptochiton stelleri*. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. Art. 856.
167. Nikolić M., Kuznetsova T., Kholodkevich S., Gvozdenović S., Mandić M. et al. Cardiac activity in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) as a biomarker for assessing sea water quality in Boka Kotorska Bay, South Adriatic Sea. *Mediterr. Mar. Sci.* 2019. Vol. 20(4). P. 680-687.
168. Niu, D., Du, Y., Wang, Z., Xie, S., Nguyen, H., Dong, Z., et al. (2017). Construction of the first high-density genetic linkage map and analysis of quantitative trait loci for growth-related traits in *Sinonovacula constricta*.
169. Ohresser M., Borsa P., Delsert C. Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: A genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997. Vol. 6. P. 123-130.
170. Ouagajjou Y., Presa P., Astorga M., Perez M. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: a genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. *J. Shellfish Res.* 2011. Vol. 30.
171. Oyarzún P. A., Toro J. E., Nuñez J. J., Suárez-Villota E. Y., Gardner J. P. A. Blue mussels of the *Mytilus edulis* species complex from South America: The application of species delimitation models to DNA sequence variation. *PLoS ONE*. 2021. Vol. 16(9). Art. e0256961.

172. Oyarzún P. A., Toro J., Garrido O., Briones C., Guiñez R. Differences in sperm ultrastructure between *Mytilus chilensis* and *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae): could be used as a taxonomic trait? *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2014. Vol. 42. P. 172-179.
173. Ozensoy Guler O., Capasso C., Supuran C. T. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2016. Vol. 31. P. 689-694.
174. Paggeot L. X., DeBiasse M. B., Escalona M., Fairbairn C., Marimuthu M. P. A. et al. Reference genome for the California ribbed mussel, *Mytilus californianus*, an ecosystem engineer. *J. Hered.* 2022. Vol. 113(6). Art. esac041.
175. Peakall R., Smouse D. A. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012. Vol. 28(19). P. 2537-2539.
176. Penalzoza C., Bishop S., Toro J., Houston R. RAD sequencing reveals genome-wide heterozygote deficiency in pair crosses of the Chilean mussel *Mytilus* spp. *10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: conference proceedings.* Vancouver, British Columbia, Canada. 2014. P. 1-3.
177. Penney R. W., Hart M. J., Templeman N. D. Shell Strength and Appearance in Cultured Blue Mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus*, and *M. edulis* × *M. trossulus* Hybrids. *N. Am. J. Aquac.* 2007. Vol. 69(3). P. 281-295.
178. Pereira J. C., Chaves R., Bastos E., Leitão A., Guedes-Pinto H. An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *Int. J. Mol. Sci.* 2011. Vol. 12. P. 8086-8095.
179. Pérez-García C., Morán P., Pasantes J. J. Karyotypic diversification in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae) inferred from chromosomal mapping of rRNA and histone gene clusters. *BMC Genet.* 2014. Vol. 15. Art. 84.
180. Perfetto R., Del Prete S., Vullo D., Sansone G., Barone C. et al. Biochemical characterization of the native α -carbonic anhydrase purified from the mantle of the

- Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017. Vol. 32(1). P. 632-639.
181. Petrov S. A., Andriyevsky O. M., Budnyak O. K., Chernadchuk S. S., Sorokin A. V. et al. Antioxidant protection system in the tissues of the Antarctic krill *Euphausia superba* and of the Black Sea shrimp *Palaemon elegans*. *Hydrob. J.* 2022. Vol. 58(5). P. 78-84.
182. Pickett T., David A. A. Global connectivity patterns of the notoriously invasive mussel, *Mytilus galloprovincialis* Lmk using archived CO1 sequence data. *BMC Res. Notes.* 2018. Vol. 11. Art. 231.
183. Plough L. V. Genetic load in marine animals: a review. *Curr. Zool.* 2016. Vol. 62(6). P. 567-579.
184. Plough L. V., Shin G., Hedgecock D. Genetic inviability is a major driver of type III survivorship in experimental families of a highly fecund marine bivalve. *Mol. Ecol.* 2016. Vol. 25. P. 895-910.
185. Ponder W., Hutchings P., Chapman R. Overview of the Conservation of Australian Marine Invertebrates. Canberra, Australia: Environment Australia, 2002. 588 p.
186. Popovic I., Matias A. M. A., Bierne N., Riginos C. Twin introductions by independent invader mussel lineages are both associated with recent admixture with a native congener in Australia. *Evol. Appl.* 2020. Vol. 13(3). P. 515-532.
187. Potts R. W. A., Gutierrez A. P., Penaloza C. S., Regan T., Bean T. P., Houston R. D. Potential of genomic technologies to improve disease resistance in molluscan aquaculture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2021. Vol. 376(1825). Art. 20200168.
188. Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. 1999. 52 p.
189. Quick-DNA™ Miniprep Kit Швидке і просте виділення ультрачистої ДНК від біологічної рідин і клітин Посібник користувача URL: https://files.zymoresearch.com/protocols/_d3024_d3025_quick-dna_miniprep_kit.pdf (дата звернення: 15.09.2021).

190. Rawson P. D., Agrawal V., Hilbish T. J. Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: Evidence for limited introgression. *Mar. Biol.* 1999. Vol. 134(1). P. 201-211.
191. Rawson P. D., Hayhurst S., Vanscoyoc B. Species composition of blue mussel populations in the northeastern gulf of Maine. *J. Shellfish Researc.* 2001. Vol. 20. P. 31-38.
192. Rawson P. D., Joyner K. L., Meetze K., Hilbish T. J. Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity (Edinb.)*. 1996. Vol. 77. P. 599-607.
193. Read B. A., Kegel J., Klute M. J., Kuo A., Lefebvre S. C. et al. Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*. 2013. Vol. 499 (7457). P. 209-213.
194. Rego I., Martínez A., González-Tizón A., Vieites J., Leira F., Méndez J. PCR technique for identification of mussel species. *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50(7). P. 1780-1784.
195. Regoli F., Giuliani M. Oxidative pathways of toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 2014. Vol. 93. P. 106-117.
196. Riginos C., Cunningham C. W. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis*×*Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14(2). P. 381-400.
197. Robledo D., Palaiokostas C., Bargelloni L., Martínez P., Houston R. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Rev. Aquac.* 2018. Vol. 10(3). P. 670-682.
198. Rodriguez-Navarro C., Cizer Ö., Kudłacz K., Ibañez-Velasco A., Ruiz-Agudo C. et al. The multiple roles of carbonic anhydrase in calcium carbonate mineralization. *CrystEngComm*. 2019. Vol. 21(48). P. 7407-7423.
199. Rosenberg G. A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *Am. Malacol. Bull.* 2014. Vol. 32. P. 308-322.

200. Saarman N. P., Pogson G. H. Introgression between invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) in the Central California hybrid zone. *Mol. Ecol.* 2015. Vol. 24(18). P. 4723-4738.
201. Sano N., Obata M., Ooie Y., Komaru A. Mitochondrial DNA copy number is maintained during spermatogenesis and in the development of male larvae to sustain the doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA system in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Growth Differ.* 2011. Vol. 53(6). P. 816-821.
202. Santaclara F. J., Espiñeira M., Cabado A. G., Aldasoro A., Gonzalez-Lavín N., Vieites J. M. Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. P. 8461-8470.
203. Secomandi S., Gallo G. R., Sozzoni M., Iannucci A., Galati E. et al. A chromosome-level reference genome and pangenome for barn swallow population genomics. *Cell Rep.* 2023. Vol. 42. Art. 111992.
204. Sergeev A., Pavlov A., Revina A., Yaropolov A. Themechanism of interaction of ceruloplasmin with superoxideradicals. *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25(11). P. 1549-1554.
205. Setini A., Pierucci F., Senatori O., Nicotra A. Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2005. Vol. 140(1). P. 153-161.
206. Sherman R. M., Forman J., Antonescu V., Puiu D., Daya M. et al. Assembly of a pan-genome from deep sequencing of 910 humans of African descent. *Nat. Genet.* 2019. Vol. 51. P. 30-35.
207. Sies H., Jones D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. Vol. 21. P. 363-383.
208. Simon A., Fraïsse C., El Ayari T., Liautard-Haag C., Strelkov P. et al. How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels. *J. Evol. Biol.* 2021. Vol. 34(1). P. 208-223.

209. Sipes I. G., Gandolfi A. J. Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons / Klaasen C. D., Amdur M. O., Doull J., eds. 3rd edn. NY: Macmillan, 1986. P. 64-98.
210. Skibinski D. O. F., Beardmore J. A., Cross T. F. Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae: Mollusca) in the British Isles. *Biol. J. Linn. Soc.* 1983. Vol. 19. P. 137-183.
211. Sneath P. H. A., Sokal R. R. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
212. Stuckas H., Knöbel L., Schade H., Breusing C., Hinrichsen H. H. et al. Combining hydrodynamic modelling with genetics: Can passive larval drift shape the genetic structure of Baltic *Mytilus* populations? *Mol. Ecol.* 2017. Vol. 26. P. 2765-2782.
213. Sumithra T. G., Neethu B. R., Reshma K. J., Anusree V. N., Reynold P., Sanil N. K. A novel ferritin subunit gene from Asian green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol.* 2021. Vol. 115. P. 1-6.
214. Sun X. W., Zhang X. F., Zhao Y. Y. et al. Development and application of microsatellite markers in aquatic species. *JFSC.* 2008. Vol. 15(4). P. 689-703. (in Chinese).
215. SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052) Ефективне отримання ДНК з харчових продуктів і кормів. Посібник користувача URL: https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/s1052_manual_prep-basic_january2022.pdf (дата звернення: 22.05.2020).
216. Theologidis I., Fodelianakis S., Gaspar M. B., Zouros E. Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution.* 2008. Vol. 62(4). P. 959-970.
217. Thiriou-Quévieux C. Advances in cytogenetics of aquatic organisms. In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* / Beaumont A. R., ed. London: Chapman and Hall, 1994. P. 369-388.

218. Tian X., Li R., Fu W., Li Y., Wang X. et al. Building a sequence map of the pig pangenome from multiple de novo assemblies and Hi-C data. *Sci. China Life Sci.* 2020. Vol. 63. P. 750-763.
219. Toptikov V. A., Aliksieieva T. G., Kovtun O. A., Totsky V. N. Genetic Structure in Different Subsequent Generations of Sexually Mature *Rapana venosa* Mollusks from the Same Biotope. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53(1). P. 13-22.
220. Toptikov V. A., Totsky V. N., Aliksieieva T. G., Kovtun O. A. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system. *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88(3). P. 5-17.
221. Toptikov V. A., Chubyk I. Y., Chebotar S. V. Distribution and polymorphism of enzymes involved in antioxidant protection and xenobiotics biotransformation in the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ukr. Biochem. J.* 2022. Vol. 94 (4). P. 67-82.
222. Toptikov V., Aliksieieva T., Kovtun O. Population genetic indices of veined rapa whelk groups of the Black Sea remote regions. *Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res. "The Wetlands Diversity"*. 2022. Vol. 24(2). P. 45-60.
223. Toro J. E., Vergara A. M. Evidence for selection against heterozygotes: post-settlement excess of allozyme heterozygosity in a cohort of the Chinese oyster, *Ostrea chinensis* Philippi, 1845. *Biol. Bull.* 1995. Vol. 188. P. 117-119.
224. Toro J., Innes D. J., Thompson R. J. Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis* – *M. trossulus* hybrid zone. *Mar. Biol.* 2004. Vol. 145(4). P. 713-725.
225. Toro J., Ojeda J. A., Vergara A. N. A. M., Castro G. C., Alcapán A. C. Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern. *J. Shellfish Res.* 2005. Vol. 24. P. 1117-1121
226. Trisciani A., Perra G., Caruso T., Focardi S., Corsi I. Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the

- Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. *Mar. Environ. Res.* 2012. Vol. 79(1). P. 29-36.
227. Uliano-Silva M., Dondero F., Dan Otto T., Costa I., Lima N. C. B. et al. A hybrid-hierarchical genome assembly strategy to sequence the invasive golden mussel, *Limnoperna fortunei*. *GigaScience*. 2018. Vol. 7. P. 1-10.
228. Väinölä R., Hvilsom M. M. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca). *Biol. J. Linn. Soc.* 1991. Vol. 43. P. 127-148.
229. Väinölä R., Strelkov P. *Mytilus trossulus* in North Europe. *Mar. Biol.* 2011. Vol. 158. P. 817-833.
230. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2006. Vol. 64(2). P. 178-189.
231. Varvio S.-L., Koehn R. K., Väinölä R. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in North Atlantic region. *Mar. Biol.* 1988. Vol. 98. P. 51-60.
232. Vendrami D. L. J., De Noia M., Telesca L., Brodte E.-M., Hoffman J. I. Genome-wide insights into introgression and its consequences for genome-wide heterozygosity in the *Mytilus* species complex across Europe. *Evol. Appl.* 2020. Vol. 13. P. 2130-2142.
233. Wang S., Zhang J. B., Jiao W. Q., Li J., Xun X. G. et al. Scallop Genome Provides Insights into Evolution of Bilaterian Karyotype and Development. *Nat. Ecol. Evol.* 2017. Vol. 1(5). Art. 0120.
234. Wei K.-J., Wood A. R., Gardner J. P. A. Population genetic variation in the New Zealand greenshell mussel: Locus-dependent conflicting signals of weak structure and high gene flow balanced against pronounced structure and high self-recruitment. *Mar. Biol.* 2013. Vol. 160. P. 931-949.
235. Wenne R., Zbawicka M., Bach L. et al. Trans-Atlantic Distribution and Introgression as Inferred from Single Nucleotide Polymorphism: Mussels *Mytilus* and Environmental Factors. *Genes (Basel.)*. 2020. Vol. 11(5). P. 1-31.

236. Westfall K. M. Molecular ecology and systematics of blue mussels (genus *Mytilus*) (Mytilidae; Bivalvia; Mollusca) in the Southern hemisphere. PhD thesis, Victoria University of Wellington, New Zealand, 2011. 275 p.
237. Westfall K. M., Gardner J. P. Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization 438 yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere. *Biol. Invasions*. 2013. Vol. 15(7). P. 1493-1506.
238. Westfall K. M., Wimberger P. H., Gardner J. P. A. An RFLP assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Mytilidae; Bivalvia) is of Northern or Southern hemisphere origin. *Mol. Ecol. Resour.* 2010. Vol. 10. P. 573-575.
239. Westfall K., Gardner J. Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Mytilidae) and the identification of non-indigenous taxa. *Biol. J. Linn. Soc.* 2010. Vol. 101. P. 898-909.
240. Wilson J., Matejusova I., McIntosh R. E., Carboni S., Bekaert M. New diagnostic SNP molecular markers for the *Mytilus* species complex. *PLoS One*. 2018. Vol. 13. Art. e0200654.
241. Winnepeninckx B., Backeljau T., De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends. Genet.* 1993. Vol. 9(12). P. 407.
242. Wong D. L., Yuan T., Korkola N. C., Stillman M. J. Interplay between carbonic anhydrases and metallothioneins: structural control of metalation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21(16). Art. 5697.
243. WoRMS. World Register of Marine Species. ULR: <http://www.marinespecies.org> (дата звернення: 28.08.2021).
244. Wu J., Bao M., Ge D., Huo L., Lv Z., Chi C., Liao Z., Liu H. The expression of superoxide dismutase in *Mytilus coruscus* under various stressors. *Fish Shellf Immunol.* 2017. Vol. 70. P. 361-371.
245. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. P. 174-181.

246. Yang J.-L., Feng D.-D., Liu J. et al. Chromosome-level genome assembly of the hard-shelled mussel *Mytilus coruscus*, a widely distributed species from the temperate areas of East Asia. *GigaScience*. 2021. Vol. 10(4). P. 1-13.
247. Yang M. S., Chan H. W., Yu L. C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*. 2006. Vol. 226(2-3). P. 126-130.
248. Yu J., Wei W., Danner E., Ashley R. K., Israelachvili J. N., Waite J. H. Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation. *Nat. Chem. Biol.* 2011. Vol. 7(9). P. 588-590.
249. Yurimoto T. Seasonal changes in glycogen contents in various tissues of the edible bivalves, pen shell *Atrina lischkeana*, ark shell *Scapharca kagoshimensis*, and manila clam *Ruditapes philippinarum* in West Japan. *J. Mar. Biol.* 2015. Art. 593032.
250. Zbawicka M., Trucco M. I., Wenne R. Single nucleotide polymorphisms in native south American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: Hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis*. *Genet. Sel. Evol.* 2018. Vol. 50(1). Art. 5.
251. Zhang G. F., Fang X. D., Guo X. M., Li L., Luo R. B. et al. The Oyster Genome Reveals Stress Adaptation and Complexity of Shell Formation. *Nature*. 2012. Vol. 490. P. 49-54.
252. Zhang Y., Zhang R., Zou J., Hu X., Wang S. et al. Fish identification and characterization of four ferritin subunits involved in immune defense of the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 34(5). P. 1178-1187.
253. Zhao H., Waite J. H. Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281(36). P. 26150-26158.
254. Zhulidov A. V., Kozhara A. V, Son M. O, Morhun H., van der Velde G. et al. Additional records of the bivalves *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831)

- (Dreissenidae) and *Arcuatula senhousia* (Benson, 1842) (Mytilidae) in the PontoCaspian region. *BioInvasions Rec.* 2021. Vol. 10(1). P. 119-135.
255. Zolotarev V. The Black Sea Ecosystem Changes Related to the Introduction of New Mollusc Species. *Mar. Ecol.* 1996. Vol. 17. P. 227-236.
256. Zouros E., Ball A. O., Saavedra C., Freeman K. R. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 7463-7467.
257. Zouros E., Foltz D. W. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia.* 1984. Vol. 25. P. 583-591.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Мікросателітний аналіз генетичного різноманіття мідій північно-західного регіону Чорного моря. *Гідробіологічний журнал*. 2023. Т. 59, № 5. С. 59-75. URL: http://www.hydrobiolog.com.ua/2023/pdf_2023_5/chubik_4.pdf (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті*).
2. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Біоінформатичний аналіз генів адгезивного білка стопи мідій роду *Mytilus*. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 2022. Т. 27, вип. 2 (51). С. 30-43. DOI: [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2\(51\).268553](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2022.2(51).268553) (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті*).
3. Toptikov V. A., **Chubyk I. Y.**, Chebotar S. V. Distribution and polymorphism of enzymes involved in antioxidant protection and xenobiotics biotransformation in the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2022. Vol. 94, no. 4. P. 67-82. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj94.04.067> (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних*).
4. **Chubyk I.**, Chebotar G., Bick A., Chebotar S. Species affiliation of the North-Western region of the Black Sea mussels based on the results of molecular-genetic analysis. *Hydrobiological Journal*. 2022. Vol. 58, no. 3. P. 68-75. DOI: <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v58.i3.60>

Чубик І. Ю., Чеботар Г. О., Бік А., Чеботар С. В. Видова приналежність мідій північно-західного регіону Чорного моря за результатами молекулярно-генетичного аналізу. *Гідробиологічний журнал*. 2022. Т. 58, № 1. С. 71-80. URL: http://www.hydrobiolog.com.ua/2022/pdf_2022_1/chubik_6.pdf

(*Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання і аналіз експериментальних даних, написання статті*).

Матеріали та тези доповідей конференцій:

1. **Chubyk I.**, Chebotar S. Genetic and biochemical analysis of groups of mussels from the Black Sea. *Natural sciences in the dialogue of generations: proceedings of the national conference with international participation*, Chisinau, Republic of Moldova, 14-15 September 2023. Chisinau: CEP USM, 2023. P. 224-225.
2. **Chubyk I.**, Kvach Y., Chebotar S. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel settlements from the North Sea. *IV International Agricultural, Biological and Life Science Conference: poster presentation and conference proceedings*, Edirne, Turkey, 29-31 August 2022. Edirne: Trakya University, 2022. P. 115-116.
3. **Chubyk I. Yu.**, Toptikov V. A., Chebotar S. V. Analysis of biochemical polymorphism of Mediterranean mussels from the Black Sea. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation: conference proceedings*, Kyiv, Ukraine, 15-17 June 2022. Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 2022. P. 77.
4. **Chubyk I. Yu.**, Stadnichenko S. V., Chebotar S. V. Polymorphism in *Me15 / Me16* and microsatellite loci of populations *Mytilus galloprovincialis* of North-western region of Black Sea. *The Importance of G. Gamow's Ideas for Biology of the 21st Century: oral presentation and theses at the Biological Session of Conference named by G. A. Gamow*, Odesa, Ukraine, 17 August 2021. Вісник ОНУ. Біологія. 2021. Т. 26, вип. 2(49). С. 126. DOI: [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2021.2\(49\).246982](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2021.2(49).246982).

5. **Chubyk I. Yu.**, Chebotar S. V. Molecular genetic studies of mussels for use in aquaculture. *Marine ecosystems: research and innovations*: oral presentation and theses at the international scientific conference, Odesa, Ukraine, 27-29 October 2021. Odesa-Istanbul, 2021. P. 19.
6. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Генетична диференціація мідій роду *Mytilus* північно-західної частини Чорного моря. *Challenges, threats and developments in biology, agriculture, ecology, geography, geology and chemistry*: proceedings of the international scientific and practical conference, Lublin, Republic of Poland, 2-3 July 2021. Lublin: Baltija Publishing, 2021. P. 128-131. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-111-4-30>.
7. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Аналіз генетичного поліморфізму *Mytilus galloprovincialis* Lam. з метою використання в аквакультурі. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матеріали I Міжнародній наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 25 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021. С. 339-341.
8. **Чубик І. Ю.**, Чеботар С. В. Мікросателітний аналіз угруповань мідій з різних акваторій Чорного моря. *Іноватика в сучасній освіті та науці: теорія і практика*: матеріали II наук.-практ. конф., м. Ужгород, 25-26 вересня 2020 р. Херсон: Молодий вчений, 2020. С. 24-26.

ДОДАТОК В



Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного університету
імені І. І. Мечникова
доцент О. В. Запороженко

АКТ

**впровадження результатів науково-дослідної роботи «Ферменти як маркери»
у навчальний процес кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики
Одеського національного університету імені І. І. Мечникова**

Комісія у складі: голови С. В. Чеботар, д.б.н., проф. та членів комісії – к.б.н., доц. С. В. Білоконь, к.б.н., доц. Н. С. Задерей в період з 1 по 5 травня 2023 р. провела роботу з визначення фактичного впровадження у навчальний процес кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики біологічного факультету ОНУ імені І.І. Мечникова результатів, отриманих при виконанні НДР «Генетико-біохімічні характеристики *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в північно-західній частині Чорного моря», яка виконується на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова та проводиться в межах наукової теми кафедри № 308 «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичного поліморфізму живих систем», ДР № 0121U109169 (01.02.2021–31.12.2025).

Комісія розглянула матеріали, які підтверджують виконання та впровадження результатів НДР у навчальний процес. Комісією встановлено, що виконавцями НДР було представлено результати визначення тканинноспецифічного профілю набору ферментів, які забезпечують антиоксидантний захист та біотрансформацію ксенобіотиків у двостулкових моллюсків. В п'яти органах (гепатопанкреас, ктенідії, мантия, нога, мускул-аддуктор) двостулкових моллюсків – мідій, було досліджено білковий поліморфізм, показано ізоалозимний тканинний розподіл захисних ферментних систем та скоординовану діяльність цих систем в органах-мішенях моллюсків виловлених з різних акваторій Чорного моря. Розглянуто можливість використання досліджуваних ферментів як біохімічних маркерів для генетичної диференціації угруповань мідій та зроблено висновки на користь застосування ДНК-маркерів.

Отримані результати мають теоретичне і практичне значення. Науковий рівень результатів НДР відповідає сучасному рівню генетико-біохімічних досліджень в Україні та світі. Робота фактично впроваджена у навчальну програму підготовки докторів філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (курс «Молекулярні маркери»). Результати генетико-біохімічного аналізу можуть слугувати в якості корисної наукової основи при виконанні кваліфікаційних робіт студентами, що включають дослідження різних представників роду *Mytilus* з використанням біохімічних маркерів.

Голова комісії: _____ проф. С. В. Чеботар
Члени комісії: _____ доц. С. В. Білоконь
_____ доц. Н. С. Задерей

12 травня 2023 р.

Даний акт не передбачає фінансових розрахунків.