14. Gibson, J. P., and S. C. Bishop. 2005. Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease : a global approach. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24(1):343–353.

15. Zinov'eva, N. A., P. M. Klenovitskiy, E. A. Gladyr', and A. A. Nikishov. 2008. *Sovremennye metody geneticheskogo kontrolya selektsionnykh protsessov i sertifikatsiya plemennogo materiala v zhivotnovodstve : Ucheb. posobie. – Modern methods of genetic control of breeding processes and certification of pedigree material in animal husbandry.* RUDN, 329 (in Russian).

16. Nei, M. 1972. The genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106:283–295.

17. Espejo, L. A., M. Endres, and J. A. Salfer. 2006. Prevalence of lameness in high-producing Holstein cows housed in freestall barns in Minnesota. *J. Dairy Sci.* 89(8):3052–3058.

УДК 595.14:[572.7:576.31:577.1]

ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КУЛЬТУРНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ДОЩОВИХ ЧЕРВЯКІВ РОДУ *EISENIA*

К. І. ТИМЧИЙ, В. Т. СМЕТАНІН, О. І. СІДАШЕНКО
Український державний хіміко-технологічний університет (Дніпро, Україна)
holoddnepr@i.ua

Досліджували морфологічні, цитогенетичні та біохімічні показники видової належності дощових черв'яків роду Eisenia з масиву вермикультури кафедри біотехнології, які були опромінені лазером типу ЛГН-208Б за різними експозиціями у часі та культивувались на різних органічних субстратах.

Дослідження показали, що лінія тварин має досить високий рівень гетерогенності, незважаючи на те, що походить з шести особин одного масиву.
Ключові слова: **морфологічні ознаки, генне маркування, видова ідентифікація**

PROBLEMS SOLUTION OF SPECIAL IDENTIFICATION OF EISENIA CULTURAL POPULATIONS

K. I. Timchy, V. T. Smetanin, O. I. Sidashenko
Ukrainian State University of Chemical's Technologies(Dnipro, Ukraine)

The morphological, cytogenetic and biochemical indices of the species belonging to the genus Eisenia were studied. The earth worms of the genus Eisenia were taken from vermiculture massif of the department of biotechnology. The earth worms were irradiated with a laser type LGN-208B at

Studies have shown that the animal line has a fairly high level of heterogeneity, despite the fact that it originates from six individuals of the same massif.
Keywords: **morphological signs, gene marking, species identification**

РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ РОДА *EISENIA*

Е. И. Тимчий, В. Т. Сметанин, О. И. Сидашенко
Украинский государственный химико-технологический университет (Днепр, Украина)

Исследовали морфологические, цитогенетические и биохимические показатели видовой принадлежности дождевых червей рода Eisenia из массива вермикультуры кафедры биотехнологии, которые были облучены лазером типа ЛГН-208б разными по времени экспозициям и культивировались на различных органических субстратах.

Исследования показали, что линия животных имеет достаточно высокий уровень гетерогенности, несмотря на то, что берет начало из шести особей одного массива.

© К. І. ТИМЧИЙ, В. Т. СМЕТАНІН, О. І. СІДАШЕНКО, 2017

Ключевые слова: **морфологические признаки, генетическое маркирование, видовая идентификация**

Вступ. Інтенсифікація різних аспектів сучасного сільськогосподарського виробництва, що основана на використанні великої кількості мінеральних добрив і хімічних засобів захисту рослин та тварин, актуалізує розробку та освоєння природо-подібних методів відновлення якості ґрунтів і донних відкладень внутрішніх водоймищ. Метою є їх успішне використання при вирощуванні культурних рослин та проведенні рекультиваційних заходів.

Одним з таких підходів є вермикультивування – розведення дощових черв'яків сімейства *Lumbricidae*, для біотрансформації виснажених ґрунтів та органічних відходів з метою отримання біогумусу.

Біотехнологічний процес одержання біогумусу ґрунтується на здатності черв'яків використовувати органічні рештки, трансформувати їх у кишечнику і виділяти у вигляді копролітів. Використання даної технології особливо актуальне наразі через те, що вміст гумусу в українських чорноземах за останніх 100 років з 4–5% знизився до 3,3%. Приймається, що ґрунт, у якому вмісту гумусу менше, ніж 2,5%, не є чорноземом [1]. Продукт життєдіяльності олігохет – вермікомпост – є високоефективним біологічно активним добривом, яке доцільно використовувати для підвищення родючості ґрунтів [2]. Дощові черв'яки відіграють важливу роль в агро-екосистемах, так як у результаті їх життєдіяльності прискорюється ферментація органічного субстрату в перегній, пришвидшується обмін азоту та структурне формування ґрунту.

Незважаючи на широке використання вермикультури у різних країнах, в Україні воно не отримало належної оцінки і освоєння. На наш погляд в Україні майже відсутня селекційна робота по створенню адаптованих до певних умов популяцій черв'яків сімейства *Lumbricidae*.

Дощові черв'яки значно відрізняються за біологічними особливостями від тварин, що традиційно розводяться у сільському господарстві. При роботі з ними з'являється селекційна проблема по оцінці їх фенотипів – складно ідентифікувати особини та оцінити їх продуктивність. У зв'язку з цим, ускладнюється основне завдання по ефективному відбору.

Сьогодні у наукових джерелах з дослідження генетичної структури природних популяцій дощових черв'яків, їх каріотипів та морфологічних особливостей представлено немало даних [3]. Але розвиток вермикультивування, в основі якого лежить розведення та промислове використання для біотрансформації дощових черв'яків, вимагає чіткої видової ідентифікації культурних ліній безхребетних тварин сімейства *Lumbricidae*.

Тому **метою нашого дослідження було** дослідити морфологічні та цитогенетичні особливості популяції черв'яків роду *Eisenia*, що формується.

Матеріали та методи досліджень. При формуванні нової популяції були використані черв'яки, придбані кафедрою біотехнології УДХТУ в асоціації „Біоконверсія'' Івано-Франківської області та попередньо характеризовані як вид *E. foetida*.

З масиву цих тварин було відібрано 6 черв'яків, які стали родоначальниками нової популяції. Після збільшення кількості до 300 тварин, нами були сформовані групи по 20 особин, кожна група опромінена лазером типу ЛГН-208Б потужністю 1 мВт, довжиною хвилі 633 нм, діаметром пучка 14 мм, різними експозиціями у часі від 5 до 30 хв. Контроль не опромінювався. Опромінених тварин розводили окремими групами і у них вивчалися морфологічні, біохімічні та цитогенетичні особливості. Дослідження проводили спільно з кафедрою природокористування Житомирського національного університету ім. І. Франко.

Було проведено морфологічне дослідження видової належності, яку визначали, користуючись визначниками для території колишнього СРСР [4], та порівнювали з описами даних видів, що наведені в роботах зарубіжних систематиків [5].

У тварин визначали інтенсивність пігментації покривів тіла. Всі подальші морфометричні дослідження проводили на фіксованих у 75% етанолі черв'яках. Методом мікроскопії

аналізували такі параметри як: довжина та діаметр тіла, загальне число сегментів, локація сегментів пояска, пубертатних валиків та першої спинної пори, тип щетинок.

Каріологічний аналіз проводили у черв'яків, відібраних у період найбільшої статевої активності (квітень – червень, серпень – початок жовтня, в нашому випадку – квітень). Препарати готували з тканини сім'яних мішків за методикою, раніше успішно використаною для дослідження каріотипів люмбріцід [6]. Черв'якам робили ін'єкції 0,1%-вого розчину колхіцину в передпояскову зону за 19 год. 20 хв. до розтину. Тварин знерухомлювали у 75%-вому розчині етанолу і розтинали по серединній спинній лінії. Вилучені сім'яні мішки гіпотонували 50 хв. в дистиляті і фіксували трьома етапами в суміші льодяної оцтової кислоти і етанолу у співвідношенні 1:3.

Хромосомні препарати виготовляли методом відбитку. Висушені препарати фарбували 10%-вим розчином азур-еозину за Романовським, приготованому на 0,01М–му фосфатному буфері (рН 6,8). Препарати аналізували за допомогою мікроскопа «Мікмед» (ок. 10, об. 90). Для аналізу пластинки фотографували за допомогою цифрової фотокамери Student Cam. Clear One Communications Inc. (SaltLakeCity, Utah, USA).

Результати досліджень. В Україні підприємства, які займаються вермикультурою, вважають, що вони працюють з «каліфорнійським черв'яком», який належить до сімейства *Lumbricidae* та відноситься до поверхнево-підстилкової групи. Всього систематики визначають 3 групи сімейства *Lumbricidae* за місцем знаходження у ґрунті: поверхнево-підстилкові, підстилкові та норники. Рід *Eisenia* належить до поверхнево-підстилкових, також до них належить рід *Dendrobena* та *Lumbricus.* Рід *Eisenia* складають наступні види: *E. foetida, E. nordenskioldi, E. gordeijiffi, E. balatonica, E. hortensis (veneta).* Таким чином, назва «каліфорнійського черв'яка» отримали гібриди від деяких видів, що були введені в культуру, але розводились безсистемно, схрещуючись не контрольовано.

Проведені дослідження показали, що досліджувані групи тварин за рядом ознак відносяться до виду *E. foetida*, а за іншими ознаками – до виду *E. venetta*, що і породило проблему видової приналежності масиву дощових черв'яків, з якими ведеться робота по формуванню нової популяції.

Так, вивчені морфологічні показники виявили, що тварини за всіма морфологічними ознаками відносяться до виду *Eisenia foetida* (табл. 1).

1. Морфологічні показники

Назва групи тварин	Довжина тіла, мм.	Діаметр тіла, мм.	Локація сегментів пояска, № сегмента	Загальне число сегментів, шт.	Локація пубертатних валиків, № сегментів	Перша спинна пора, № сегмента	Тип щетинок
5 хв. опромінення	43 ± 1	2,5 ± 0,6	26–33	117 ± 2	29–31	після 4 сегмента	попарні не зближені
10 хв. опромінення	41 ± 2	3,5 ± 0,5	26–31	113 ± 2	27–30	після 4 сегмента	попарні не зближені
15 хв. опромінення	48 ± 1,5	3,5 ± 0,7	26–31	108 ± 1	28–30	після 4 сегмента	попарні не зближені
20 хв. опромінення	37 ± 1,5	3,0 ± 0,2	27–32	113 ± 3	26–30	після 4 сегмента	попарні не зближені
25 хв. опромінення	47 ± 1,5	2,5 ± 0,4	26–32	109 ± 2	28–30	після 4 сегмента	попарні не зближені
30 хв. опромінення	48 ± 0,5	3,0 ± 0,6	26–33	105 ± 2	28–31	після 4 сегмента	попарні не зближені
не опромінені контроль	45 ± 2	3,5 ± 0,3	26–32	101 ± 2	29–31	після 4 сегмента	попарні не зближені

Під час дослідження цитогенетичних показників встановлено, що каріотип тварин складав 36 хромосом (рис. 1), а повинно бути 22. Лише вид *Eisenia foetida* має у своєму складі 22 хромосоми, а каріотипи всіх інших видів роду *Eisenia* мають по 36 хромосом.

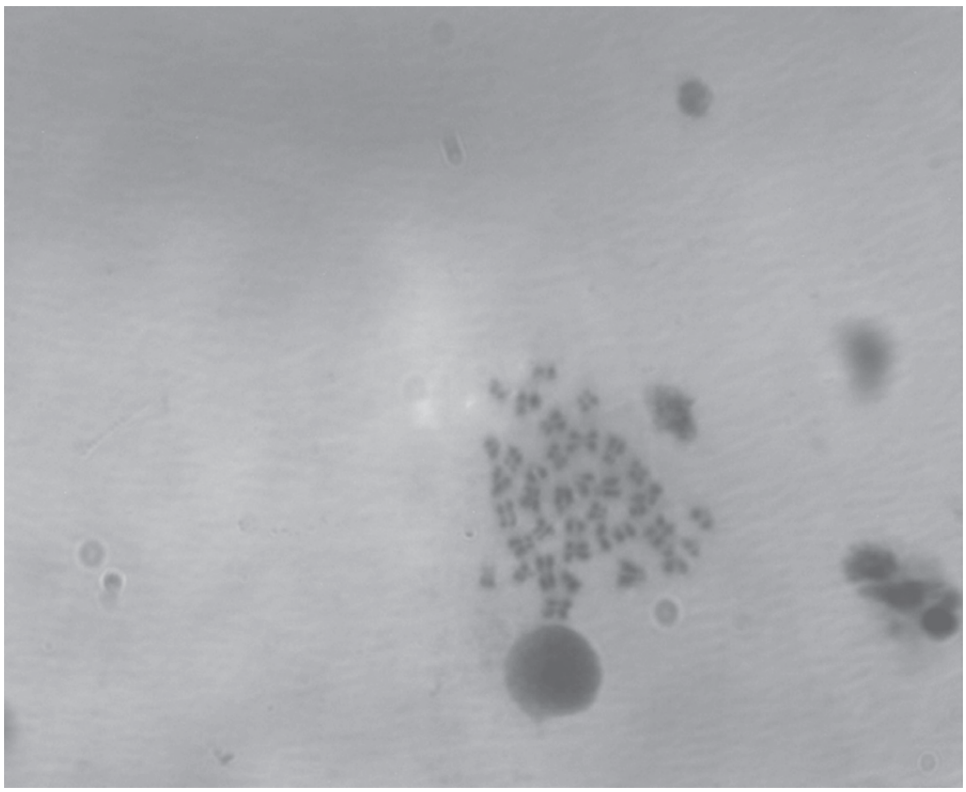

Рис. 1. **Метафазна пластинка черв'яка виду Eisenia (veneta) 2n = 36**

Лінійні параметри хромосом були визначені з використанням програми mScope (OSLinux), які показали, що каріотип складається з: 6 – метацентричних; 15 – субметацентричних, них 2 великі; та 15 – акроцентричних хромосом, з них 2 великі.

У зв'язку з цим, вирішення питання видової приналежності потребувало інших методів досліджень. Тому було проведено біохімічно-генне маркування за ферментними системами, зокрема неспецифічними естеразами.

Генетичне маркування здійснювали методом електрофорезу у 7,5%-му поліакриламідному гелі Тріс-ЕДТА·Na_2-боратній системи з pH = 8,5 [7] 1 год. 20 хв. при напрузі 200 V і силі струму 140 mA екстрактів хвостової частини тіла. Екстракт ферментів та білків отримували шляхом подрібнення кількох кінцевих сегментів тіла розміром 5–10 мм у дистиляті у співвідношенні 1:1. Після вимкнення електричного струму гель обробляли розчином, що містить спеціальний субстрат, який специфічно реагує з досліджуваним ферментом, утворюючи на гелі плями, що відповідають спектрам ферментів. Генотип особини по локусу, що кодує досліджуваний фермент, визначають за характером розподілу рисок на гелі [8].

Неспецифічні естерази різних видів роду *Eisenia* відрізняються між собою за молекулярною масою. Так, у родів *E. andrei* та *E. foetida* естерази мають меншу масу, ніж естерази *E. veneta.*

Наші дослідження показали, що за показником знаходження спектрів неспецифічних естераз, як видно з електофореграми (рис. 2), досліджувані особини відносяться до виду *E. veneta*.

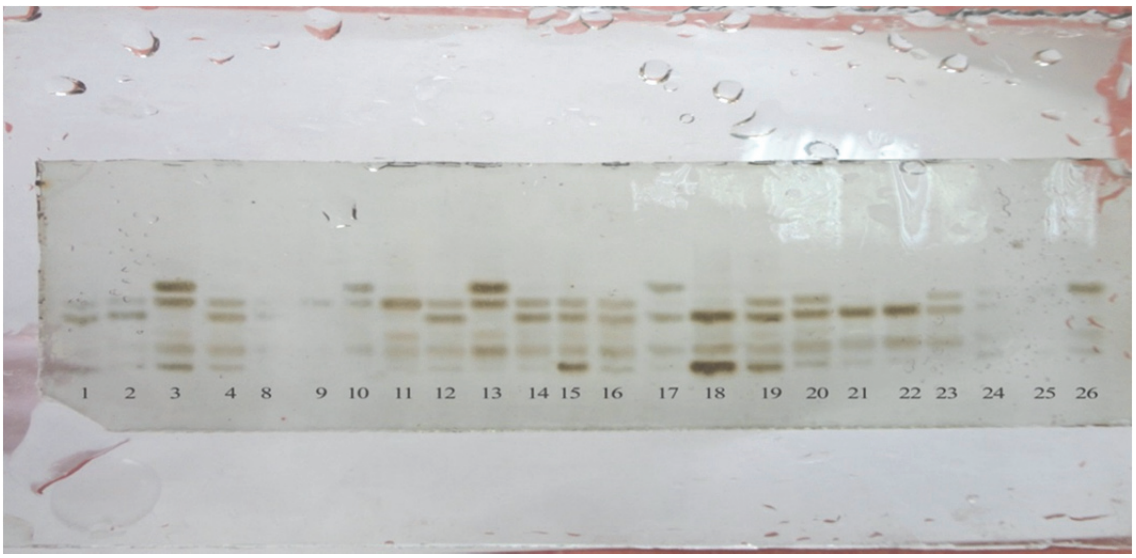

Рис. 2**. Електрофореграма спектрів неспецифічних естераз черв'яків виду Eisenia (veneta)**

Висновки. Проведені дослідження можуть бути теоретичною гіпотезою для визначення видової ідентифікації тварин у вермикультурі та створенні біологічного різноманіття у її популяції. Незважаючи на те, що вона бере початок з 6-ти особин, отриманих з одного масиву тварин, поліморфізм за естеразами показав достатньо високий рівень гетерогенності формуючої лінії, що свідчить про резерв її генетичної мінливості і дає надію на успішний її розвиток у майбутньому.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Гармаш, С. Н. Биоконверсия органических отходов предприятий агропромышленного комплекса / С. Н. Гармаш, А. П. Кулик, Н. И. Ванжа // Матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції "Наука і освіта", лютий 2004. – Т. 12. Сільське господарство. – Дніпропетровськ : Наука і освіта, 2004. – С. 41–42. (*Оброблений матеріал по об'єму рослинних відходів агропромислового комплексу підприємств України).*

2. Метью, Р. Вернер. Устойчивое земледелие и экология дождевого червя // Пер. с англ. Н. Степанова. www.vermik.narod.ru

3. Межжерин, С. В. Генетическая структура популяций партогенетического дождевого червя Eiseniela Tetraedra (Savigny, 1826) в естественной и урбанизированной среде обитания / С. В. Межжерин, И. Ю. Коцюба, О. В. Гарбар // Науковий вісник Ужгородського університету – 2010. – Вип. 28. – С. 135–138.

4. Всеволодова-Перель, Т. С. Дождевые черви фауны России. Кадастр и определитель / Т. С. Всеволодова-Перель. – М. : Наука, 1997. – 104 с.

5. Bouché, M. B. Lombriciens de France. Ecologie et systématique / M. B. Bouché // Ann. Zool. - écol. Anim. – 1972. – Vol. 72, № 2. – C. 1–671.

6. Гарбар, А. В. Кариотипы трех видов рода Aporrectodea (Oligochaeta:Lumbricidae) фауны Украины / А. В. Гарбар, Р. П. Власенко // Тезисы IV Междунар. конф. по кариосистематике беспозвоночных животных. – Санкт-Петербург, 2006. – С. 16.

7. Peacock, F. C. Serum protein electrophoresis in acrilamyde gel patterns from normal human subjects / F. C. Peacock, S. L. Bunting, K. G. Queen // Science. – 1965. – Vol. 147. – P. 1451–1455.

8. Гарбар, О. В. Комплексне каріологічне та морфологічне дослідження ставковиків фауни України: Автореф. дис. … канд. біол. наук / Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАНУ. – К., 2001.– 20 с.

9. Перель, Т. С. Новые виды рода Eisenia (Lumbricidae, Oligochaeta) и их хромосомные наборы / Т. С. Перель, А. С. Графодатский // Зоол. журн. – 1984. – Т. 63, № 4. – С. 610–612.

10. Иванцив, В. В. Щетинковый аппарат дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) и его использование в диагностике таксонов видовой группы / В. В. Иванцив // Вестник зоологии. – 1989. – № 3. – С. 76–77.

11. Логвиненко, Б. М. Сравнение некоторых видов дождевых червей семейства Lumbricidae (Oligochaeta) по электрофоретическим спектрам общих белков / Б. М. Логвиненко, О. П. Кодолова, Н. М. Болотецкий //Докл. АН СССР. – 1984. – Т. 275, № 5. – С. 1253–1255.

REFERENCES

1. Garmash, S., A. Kulik, and N. Vanzha. 2004. Biokonversiya organicheskikh otkhodov predpriyatiy Agropromyshlennogo kompleksa – Bioconversion of organic waste from enterprises of agroindustrial complex. *Selskoye hozyaystvo – Agriculture*. – 12:41–42 (in Ukraine).

2. Verner, M. Ustoychyvoe zemledelye y ekolohiya dozhdevoho chervya – Sustainable agriculture and ecology of earthworm. *Per. s anhl. N. Stepanova – Translated from english by N. Stepanova*. www.vermik.narod.ru

3. Mezhzheryn, S., Y. Kotsyuba, and O. Harbar. 2010. Henetycheskaya struktura populyatsii partohenetycheskoho dozhdevoho chervya Eiseniela Tetraedra (Savigny, 1826) v estestvennoy y urbanyzyrovannoy srede obytanyya – The genetic structure of populations of the partogenetic earthworm Eiseniela Tetraedra (Savigny, 1826) in a natural and urbanized habitat. *Naukovyy visnyk Uzhhorodskoho universytety – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*. – 28:135–138 (in Russian).

4. Vsevolodova-Perel, T. 1997. *Dozhdevyye chervi fauny Rossii. Kadastr i opredilitel – Rainworms of the fauna of Russia. Cadastre and determinant.* M.: Nauka, 104 (in Russian).

5. Bouche, M. 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systematique. 1972. *Ann. Zool. – ecol. Anim.* 72(2):1–671.

6. Garbar, A., and R. Vlasenko. 2006. Kariotipy treh vidov roda Aporrectodea (Oligochaeta : Lumbricidae) fauny Ukrainy – Karyotypes of three species of the genus Aporrectodea (Oligochaeta : Lumbricidae) of Ukrainian fauna. *Kariosistematika bespozvonochnykh zhivotnyh – Karyosystematics of invertebrate animals*. – Sankt-Peterburg, 16 (in Russian).

7. Peacock, F., S. Bunting, and K. Queen. 1965. *Serum protein electrophoresis in acrilamyde gel patterns from normal human subjects.* Science. – 147:1451–1455.

8. Garbar, O. V. 2001. *Kompleksne kariologichne ta morfologichne doslidzhennya stavkovikiv fauni Ukraini – Comprehensive karyological and morphological study of pond fauna of Ukraine*: *Author. Dis. forobtaining Sciences. degree candidate. Biological sciences.* Kiev, 20 (in Ukraine).

9. Perel, T., and A. Grafodatskiy. 1984. Novie vidy roda Eisenia (Lumbricidae, Oligochaeta) i ih hromosomnye nabory – New species of the genus Eisenia (Lumbricidae, Oligochaeta) and their chromosome sets. *Zool. Zhurnal – Journal of Zoology*. 63(4):610–612 (in Russian).

10. Ivantsiv, V. 1989. Shchetinkoviy apparat dozhdevyh chervey (Lumbricidae, Oligochaeta) i ego ispolzovanie v diagnostike taksonov vidovoy gruppy – The bristle apparatus of earthworms (Lumbricidae, Oligochaeta) and its use in the diagnosis of species group taxa. *Vestnik zoologii – Vestnik of Zoology*. 3:76–77 (in Russian).

11. Logvinenko, B., O. Kodolova, and N. Bolotetskiy 1984. Sravnenye nekotoryh vidov dozhdevyh chervey semeystva Lumbricidae (Oligochaeta) po elektroforeticheskim spektram obshchikh belkov – Comparison of some species of earthworms of the family Lumbricidae (Oligochaeta) by electrophoretic spectra of common proteins. *Dokl. AN SSSR – Dokl. Academy of Sciences of the USSR.* 275 (5):1253–1255 (in Russian).