

УДК 575.639.3

DOI <https://doi.org/10.32851/wba.2020.2.14>

ІСТОРИЯ, СТВОРЕННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ ТРАНСГЕННИХ РИБ

Костенко С.О. – д.б.н., професор,

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
svitlanakasijan@ukr.net*

Аквакультура залишається одним з швидкозростаючих секторів виробництва білків тваринного походження у світі. Зі збільшенням попиту на продукти харчування, отриманих шляхом аквакультури, виникла потреба в більш ефективних технологічних системах, що переважають традиційні за прискореними темпами росту риби, ефективністю конверсії корму, зменшенням смертності від хвороб та пов'язаним з ним використанням хімікатів, низьким рівнем кисню, низькою плодючістю. Біотехнологія відкрила нові можливості для розвитку генетичних ресурсів аквакультури. Нового поштовху біотехнологія об'єктів аквакультури зазнала завдяки розвитку генетичної інженерії.

Риби виявилися одними із найзручніших тваринних об'єктів молекулярної біотехнології. Це обумовлено їх багатоплідністю, здатністю до зовнішнього запліднення та розвитку ебріонів поза організмом матері.

Трансгенні риби створені з різною метою: 1) модельні системи в генетиці, біології розвитку, токсикології, фізіології, фармакології; 2) продуктивні тварини, що характеризуються швидким ростом, толерантністю до холоду, стійкістю до інфекцій; 3) риби-біореактори для експресії біохімічно важливих білків; 4) тестерні об'єкти для виявлення токсичності середовища; 5) декоративні лінії в акваріумістиці.

З розвитком генної інженерії вдосконалювались методи створення трансгенних риб та інших об'єктів аквакультури. В даний час використовується декілька способів отримання трансгенних риб, усі вони полягають у використанні трансгенної конструкції з промотором і чужорідним геном. На першому етапі чужорідний ген (трансген), що переноситься в організм господаря, інтегрують у вектор, на другому етапі за допомогою клонуючого вектора ген вбудовують в геном господаря. В якості векторів на перших етапах використовували плазмідні *E. coli*, що здатні реплікуватися з високою копійністю у клітинах господаря. Необхідна для переносу послідовність ДНК була вбудована в клонуючий (або експресуючий) вектор за допомогою рестрикційних ферментів, щоб створити комплементарні кінці, а також лігази, щоб закріпити інтеграцію.

Такий класичний підхід до клонування, що займає багато часу, неефективний, тому що іноді важко знайти сайти рестрикції в цільовій послідовності ДНК. На сьогодні використовують інші методи клонування цільової ДНК, які мають переваги за швидкістю. Для введення трансгенів в геном риб використовують декілька різноманітних векторів: плазмідні *E. coli*, бактеріальні штучні хромосоми (БШК, *Bacterial artificial chromosomes* (BAC)), фосміди (fosmids), ретровіруси, транспозони.

Інженерія індивідуальних нуклеаз дозволяє індукувати дволанцюгові розриви послідовності ДНК (doublestrandbreaks, DSBs), які потім використовують для

наступних модифікацій. Три методи отримали найширше використання: 1) короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs); 2) транскрипційно активатор-подібні ефекторні нуклеази (transcription activator like effector nucleases, TALENs); 3) нуклеази цинкових пальців (zinc finger nucleases, ZFNs).

Розвиток ГМ-риб давно викликав дискусії щодо можливого впливу на навколишнє середовище. Основні екологічні застереження щодо потрапляння трансгенних риб у природні екосистеми стосуються їх конкуренції з дикими популяціями, міграції трансгену в генофонд диких видів, та екологічні зміни, які вони викликають.

Ключові слова: аквакультура, генетично модифікована риба, трансгенез, екологічні ризики.

Вступ. Неухильне зростання населення Землі потребує постійного збільшення обсягів виробництва продуктів харчування, за даними ФАО ще з початку 1980-тих років більшість природних запасів у морських водах було виловлено на максимально можливих рівнях. Аквакультура залишається одним з найбільш швидкозростаючих секторів виробництва білків тваринного походження у всьому світі. Фактично, це єдине виробництво продукції тваринництва, яке зростає швидше, ніж населення землі, і цим забезпечує прийнятне доповнення і заміщення виловленої риби. У 2014 році вперше аквакультура дала людству більше продукції рибництва ніж рибальство. За прогнозами, ця частка аквакультури зросте до 62 % до 2030 року [1] (ФАО, 2014 рік).

Починаючи з 1961 року, темпи росту споживання риби у світі вдвічі перевищують темпи приросту населення планети, доказуючи, що рибогосподарському сектору відведена виключно важлива роль у рішенні поставленого ФАО завдання по створенню світу, вільного від проблеми голоду і неповноцінного харчування. Загальний об'єм виробництва продукції аквакультури (водні рослини включно) досягнув у 2016 році 110,2 млн. тонн. Споживання риби збільшилось з 9,0 кг у 1961 році до 20,2 кг у 2015 році, тобто його щорічний приріст склав у середньому півтори відсотки [4; 6].

У 2017 році на частку риби припадало близько 17 % тваринного білка і 7 % всього споживаного білка в раціоні світового населення. Більше 3,3 млрд. людей отримували з риби понад 20 % тваринного білка [6].

Зі збільшенням попиту на продукти харчування, отриманих шляхом аквакультури, виникла потреба в більш ефективних технологічних системах, що переважають традиційні за прискореними темпами росту риби, ефективністю конверсії корму, зменшенням смертності від хвороб та пов'язаним з ним використанням хімікатів, низьким рівнем кисню, низькою плодючістю [7; 8]. Біотехнологія відкрила нові можливості для розвитку генетичних ресурсів аквакультури. Нового поштовху біотехнологія об'єктів аквакультури зазнала завдяки розвитку генетичної інженерії.

Риби виявилися одними із найзручніших тваринних об'єктів молекулярної біотехнології. Це обумовлено їх багатоплідністю, здатністю до зовнішнього запліднення та розвитку ебріонів поза організмом матері.

Починаючи з 1980-х років були створені трансгенні тварини (що несуть чужинні ДНК, отримані з екзогенного джерела і перенесені в їх геном) самих різних видів, в тому числі ссавців, птиця, земноводних, риб та безхребетних тварин [4–10]. Трансгенну технологію продовжують використовувати в біологічних, медичних дослідженнях, сількому господарстві, аквакультурі.

Матеріали та методи досліджень. Стаття написана на основі огляду наукових даних з рецензованих публікацій, що стосуються створення трансгенних об'єктів аквакультури.

Історія створення трансгенних риб. Про перший експеримент пов'язаний з ін'єкцією клонованих генів в ікринки веселкової форелі повідомили вчені Norman Maclean та S. Talawar з університету Southampton UK (Велика Британія) у 1984 році [11]. У 1985 році Zuoyan Zhu з Інституту гідробіології Китайської Народної Республіки з'явилась інформація про створення першої генетично модифікованої або трансгенної риби (Zhu et al., 1985) [12]. ДНК-конструкція, яку використали для створення трансгенної риби, складалася з гормону росту людини та промотора металотіонеїну миші. Вектор було введено шляхом мікроін'єкції в зародковий диск заплідненої ікринки золотої рибки (*Carassius auratus*) [12], а потім амурського в'юна (*Misgurnus anguillicaudatus*, Cantor) [13], що призвело до створення «швидко зростаючих» трансгенних риб. Рекombінантний гормон росту (GH) згодом був введений у білого амура (*Stenopharyngodon idellus*) [14], який виявився вдалим об'єктом сучасної аквакультури [15].

Трансгенні рибистворені різною метою: 1) модельні системи в генетиці, біології розвитку, токсикології, фізіології, фармакології [6]; 2) продуктивні тварини, що характеризуються швидким ростом, толерантністю до холоду, стійкістю до інфекцій [8]; 3) риби-біореактори для експресії біохімічно важливих білків [16]; 4) тестерні об'єкти для виявлення токсичності середовища [17]; 5) декоративні лінії в акваріумістиці [18; 19].

З розвитком генної інженерії вдосконалювались методи створення трансгенних риб та інших об'єктів аквакультури.

В даний час використовується декілька способів отримання трансгенних риб, усі вони полягають у використанні трансгенної конструкції з промотором і чужорідним геном. На першому етапі чужорідний ген (трансген), що переноситься в організм господаря, інтегрують у вектор, на другому етапі за допомогою клонуєчого вектора ген вбудовують в геном господаря. В якості векторів на перших етапах використовували плазміди *E. coli*, що здатні реплікуватися з високою копійністю у клітинах господаря.

Необхідна для переносу послідовність ДНК була вбудована в клонуєчий (або експресуючий) вектор за допомоги рестрикційних ферментів, щоб створити комплементарні кінці, а також лігази, щоб закріпити інтеграцію.

Такий класичний підхід до клонування, що займає багато часу, неефективний, тому що іноді важко знайти сайти рестрикції в цільовій послідовності ДНК. На сьогодні використовують інші методи клонування цільової ДНК, які мають переваги за швидкістю. Наприклад, In-Fusion (Clontech) і Gateway (Life Technologies). Клонування In-Fusion дозволяє лігувати фрагмент ДНК з 15-ма гомологічними нуклеотидами на їх лінійних кінцях та лінеаризований вектор з використанням власного ферменту In-Fusion, поксвірусу (рохвірусу) (ДНК-полімерази з 3'-5' екзонуклеазною активністю). Система клонування Gateway – це сайт-специфічна рекомбінація за використання компонентів системи λ (лямбда) для переносу ДНК *in vitro*, білок λ інтеграза (λ integrase protein, Int), білок λ excisionase (λ excisionase protein, Xis), IHF білок *Escherichia coli* та послідовність ДНК для рекомбінації [20].

Для введення трансгенів в геном риб використовують декілька різноманітних векторів: плазміди *E. coli*, бактеріальні штучні хромосоми (БШК, Bacterial artificial chromosomes (BAC)), фосміди (fosmids), ретровіруси, транспозони [21].

Бактеріальні штучні хромосоми широко використовують при вивченні функцій генів риби-зебри та механізмів їх регуляції. Клоновані BAC здатні зберігати великі вставки ДНК (до 300 кб) і тому мають потенціал для введення великої послідовності, яка включає повну генну структуру.

Фосміди є однокопійними плазмідами, які здатні виступати в ролі вектора великих інсерцій ДНК. Ця система була успішно застосована для одержання трансгенного репортерного гена *Cyp1a* при дослідженні риби-зебри за допомогою діоксину у цільових тканинах [22]. Великий розмір BAC клонів і фосмід призводить до низької ефективності їх використання для отримання трансгенних ліній.

Ретровіруси виявилися дуже вдалимi системами для створення трансгенних риб. Вірус лейкозу мишей Moloney (Moloney murine leukemia virus, MLV) здатний до зараження різноманітних клітин господаря, у тому ж числі риби-зебри. Ретровірусна вставка була використана при застосуванні генних ловушок (gene traps, GT), енхансерних ловушок (enhancer traps, ET) та білкових ловушок (protein traps, PT) натрагсгенні рибі-зебрі в екотоксикології упоєнанні з типовими трансгенними репортерними послідовностями [23]. Ці ловушки виявилися ефективними для ідентифікації транскрипційної активності генів та аналізу їх функції (зворотній генетичний скринінг, reverse genetic screening). MLV використовували в великоекранному енхансерному скринінгу (large-scale enhancer detection

screen) для вставки в енхансернуловушку вектора у риби-зебри [24]. Ці підходи використали для інсерції в промотор та репортерну послідовність (наприклад, GFP) в геном через MLV вектор для ідентифікації і характеристики регуляторної генної активності протягом розвідку. Псевдотипова (pseudotyped) MLV система показала себе найбільш ефективним та результативним методом трансгенної інсерції у зародкових лініях, які здатні передавати її майже усім нащадкам F1, в середньому 10 копій на клітину [25; 26]. Через труднощі пов'язані з отриманням високоточних вірусів і обмеженням в розмірі ділянки, яка переноситься, більш популярними для використання стали транспозони [23].

Транспозони – це послідовності ДНК, здатні пересуватися безпосередньо з одного локусу у інший в межах однієї або різних хромосом в клітині. Існує два типи транспозонів: автономні та неавтономні. Автономний транспозон кодує свій власний фермент (транспозазу) і може пересуватися. Неавтономний транспозон не кодує власні білки транспозиції і вимагає транспозиційної активності, яка може бути реалізована за рахунок мРНК, для включення його пересування. Для транснезезу можна використовувати штучний спосіб продукування транспозиції [27]. Використання транспозонів вимагає індукції транспозазу в одноклітинній заплідненій ікринці шляхом мікроін'єкції разом з транспозиційною мРНК. Транспозони Tol2 і Спляча Красуня (Sleeping Beauty, SB) є основними транспозонами, яких використовують при створенні трансгенних риб-зебр. Обидва ці методи використовують ферменти для полегшення інтеграції чужорідної ДНК в геном господаря. Tol2 система транспозонів, отримана від медаки (medaka) і належить до hAT (hobo / Ac / Tam3) родини транспозонів, широко використовується у роботах на рибі-зебрі, а також інших хребетних, завдяки високій ефективності доставки генів та їх експресії [28].

Використання конструкції Tol2, спільно ін'єкваної з мРНК транспозазу дає 50 % частоту успішної передачі у зародкової лінії [27]. Ця векторна транспозонна система корисна для продукування стабільних трансгенних риб, аналізу активації промотора, енхансера або гену, що представляє інтерес в аналізі тимчасової експресії. Мова йде експресію генів, які працюють на первному етапі розвитку організму [29]. Оскільки транспозон Tol2 виділений з геному медаки (medaka), ця система не може бути використана у цього виду, тому що вона має ендогенну активність.

Спляча красуня – це реактивний транспозон з суперродини транспозибельних елементів (Tc1 / mariner transposable), виділений з риби, що активно використовується при створенні трансгенних моделей риби-зебри [30]. Однак, швидкість транснезезу за використання сплячої красуні нижча, ніж для Tol2 (близько 30% [31]), і тому останній використовують частіше. Тоді як транспозазу використовують для отримання численних

однокопійних вставок, мегануклеази дають можливість для для одиначної низькопопійної інсерції [27].

Мегануклеазні ділянки геному дозволяють отримати одну високо специфічну по місцю інсерції специфічну вставку [32] Tol2 – допоміжна вставка залишається найбільш надійною та ефективною системою для посередництва у трансгенезі при створенні стабільних трансгенних ліній.

У результаті інтеграції чужорідної ДНК у різні ділянки геному спостерігається так званий ефект позиції, який виражається у змінній експресії трансгенів [33]. Винятком є нещодавно розроблений PhiC31 метод націлювання на основі інтеграції, розроблений на рибі-зебрі. Цей метод забезпечує високовідтворювані закономірності трансгенної активності і дає можливість попереднього відбору успішно вбудованих націлених інтеграцій на ранньому етапі тварин ін'єкційного покоління [33–35].

Інженерія індивідуальних нуклеаз дозволяє індукувати дволанцюгові розриви послідовності ДНК (double strand breaks, DSBs), які потім використовують для наступних модифікацій. Три методи отримали найширше використання: 1) короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs); 2) транскрипційно активатор-подібні ефекторні нуклеази (transcription activator like effect or nucleases, TALENs); 3) нуклеази цинкових пальців (zinc finger nucleases, ZFNs).

ZFNs були широко застосовувалися до теперішнього часу, але мають складність у використанні та високу вартість. CRISPR – особливі локуси бактерій і архей, що складаються з прямих повторюваних послідовностей, які розділені унікальними послідовностями (спейсерами). Повтори мають довжину від 24 до 48 парнуклеотидів; вони мають бівалентну симетрію, але, як правило, не є істинними паліндромами (послідовностями нуклеотидів, які можна читати у напрямку 5'-3' на одному ланцюгу та в напрямку 5'-3' на другому, комплементарному першому). Повтори розділені варіабельними ділянками ДНК, спейсерами, приблизно однакової довжини. Спейсери відповідають нуклеотидними послідовностями певним фрагментам ДНК чужорідних генетичних елементів (протоспейсерам). У зв'язку з цим було запропоновано і потім показано, що послідовності, що розділяють повтори, походять з послідовностей геномів бактеріофагів, і, відповідно, забезпечують захист клітин від інфікування цими вірусами бактерій. РНК, які транскрибуються з локусів CRISPR, спільно з асоційованими білками Cas, забезпечують адаптивний імунітет за рахунок їх комплементарного зв'язування з нуклеїновими кислотами чужорідних елементів і подальшого руйнування їх білками Cas [36].

Використання методик CRISPR-Cas для спрямованого редагування геномів є перспективним напрямком сучасної генної інженерії. В даний

час вчені широко використовують підходи, засновані на системах CRISPR-Cas; можливо, в майбутньому ці підходи будуть застосовувати в медицині для лікування спадкових захворювань.

Hwang et al. використали CRISPR – Cas9 RGN для отримання сайт-специфічних нуклеотидних делецій або замін в геномі риби-зебри, було показано, що в зародковій лінії передача мутацій досягає 100 % [37]. Оуер та його колеги з того часу продемонстрували використання CRISPR–Cas9 RGN для посередництва локус-специфічних інсерцій ДНК-касет [38].

Використання раніше зареєстрованих трансгенних ліній риби-зебри, Auer та ін. (2014) [38] мали змогу введення послідовності репортерного гену GFP в послідовність *KalTA4* (альтернативна версія *Gal4* [39], що призводить до експресії *KalTA4* в формально GFP-позитивні клітини. Точність та ефективність система редагування CRISPR–Cas9 зробила RGN перспективним інструментом та альтернативою використанню морфолінів для виключення (заглушення) гена, а також для створення трансгенних репортерних ліній риби-зебри [40].

TALEN складаються з неспецифічних Fuc I нуклеаз, з'єднаних з настроюваним ДНК-зв'язуючим доменом, що складається з висококонсервативних повторів, отриманих із TALEN, білки, які виділяються зонами *Zanthomonas spp.* бактерії для зміни генної транскрипції в клітинах рослини-господаря [41].

За допомогою метода TALEN були успішно отримані мутації в генах-мішенях риби-зебри [42]. На думку деяких вчених TALEN мають більш широкий діапазон націлювання порівняно з CRISPR, оскільки майже немає обмежень у цільовій послідовності. Однак, їх складніше побудувати [43].

Систему експресії GAL4 – UAS використовують в трансгенних моделях риби зебри та ксенопуса (*Xenopus*) векотоксикології [44]. Система GAL4 / UAS – це біохімічний метод, який застосовується для вивчення експресії генів та їх функцій у різних модельних організмів. Система GAL4 / UAS була розроблена Андре Брендом і Норбертом Перимоном у 1993 році і є потужним інструментом для вивчення експресії генів. Дана система складається з двох частинта використовує ген GAL4, що кодує транскрипційний активатор дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*), і енхансер UAS (Upstream Activated Sequence), який активується фактором GAL4 та запускає транскрипцію генів під його контролем [45].

UAS зливається з геном ефекту, який мовчить, якщо GAL 4 активатор відсутній. GAL4 може експресуватися багатьма різноманітними шляхами під контролем різних тканино-специфічних промоторних послідовностей *Drosophila melanogaster* [46]. Багато ліній GAL4 були розроблені і широко використовуються для ектопічної експресії генів (експресія гена в ненормальному місці в організмі), які представляють інтерес для дослідників.

Система GAL4–UAS також була застосована на риби-зебрі, що дало можливість створення різних трансгенних моделей у т.ч. для вивчення роботи нейронних ланцюгів і нейронів [29; 31], екотоксикології [47].

Недоліки у створенні трансгенних ліній за використання системи UAS полягають у тому, що ці послідовності можуть бути схильними до CpG метилювання і, таким чином, пригнічення (заглушення), особливо при високих UAS копійності [48]. Були зроблені спроби вирішити цю проблему шляхом модифікації UAS для пом'якшення сайленсерів (глушників) [49]. Нещодавно розроблені альтернативні двох частинні репортерні системи риби-зебри, які не схильні допригнічення транскрипції, включаючи регуляторну систему Q транскрипції та триптофан репресор [50]. Q транскрипційна регуляторна система, отримана з генів *Neurospora crassa*, подібна до системи GAL4–UAS. Транскрипційний активатор QF зв'язується з QUAS передрегулюючою послідовністю і індукуює експресію цільових генів. Транскрипційне заглушення системи Q не відбувається, тому що сайт для зв'язування QF не несе істотних CpG динуклеотидних послідовностей, які піддаються метилюванню ДНК [51].

Останнім часом репресори триптофану E використовують у стабільних умовах трансгенних ліній риби-зебри. Регуляторний білок (репресор) може зв'язуватися з сайтом оператора триптофану і стає активним лише тоді, коли це пов'язано з триптофаном. Зв'язування триптофану з триптофановим репресорним білком викликає зміну конформації в репресорі.

В даний час близько 40–50 лабораторій у світі працюють над створенням трансгенних риб. Близько десяти з них знаходяться в США та Китаї, а решта в Канаді, Австралії, Новій Зеландії, Ізраїлі, Бразилії, Кубі, Японії, Сінгапурі, Малайзії та інших країнах. Основні комерційні цілі створення трансгенних риб пов'язані з швидкістю росту, конверсією корму, стійкістю до низьких температур. З цією метою були отримані комерційні трансгенні лінії лосося, форелі, карпа, тилапії та інших видів тварин [53].

Розвиток ГМ-риб давно викликав дискусії щодо можливого впливу на навколишнє середовище [54; 55]. Основні екологічні застереження щодо потрапляння трансгенних риб у природні екосистеми стосуються їх конкуренції з дикими популяціями, міграції трансгену в генофонд диких видів, та екологічні зміни, які вони викликають [55].

Окрім наукових питань створення ГМ-риб із бажаними властивостями та підтримання цих ознак у рамках природного, статевого та штучного відбору, існують проблеми етичності, харчової безпечності, що поєднуються з економічними, соціальними та політичними питаннями. Однак, з точки зору прісноводних екосистем та рибного господарства, головне занепокоєння ГМ-риб полягає у впливі, який вони можуть мати на біотичні та абіотичні компоненти екосистеми. Багато питань є аналогічними

тим, що пов'язані з інвазивними видами [56]. Через відсутність польових даних прогнозування результатів ГМ-риби у природних умовах вважається складним або більшим, ніж передбачення того, чи вторгнуться немодифіковані види в нову екосистему чи ні. Однією з найбільших екологічних проблем, викликаних трансгенними рибами, є можливість того, що трансгенні види втечуть і поширять нові ознаки в екосистемі шляхом їх розмноження з дикими родичами – (біологічний процес, відомий як «потік генів»). Генний потік між трансгенною або умовно виведеною рибою та дикими популяціями є екологічним фактором, оскільки це може становити загрозу природному біорізноманіттю. Деякі дослідники вважають, що генетичні відмінності, введені в трансгенну рибу, можуть впливати на її чистий фітнес, науковий термін, що означає здатність організму вижити і передавати його гени майбутнім поколінням.

Якщо трансгенна риба потрапить у навколишнє неконтрольоване середовище і спарується з дикою рибою, то потік генів від ГМО може слідувати одному з трьох сценаріїв.

1. Схема очищення, коли придатність трансгенної риби нижча, ніж у її диких родичів, природний відбір швидко очистить від дикої природи будь-які нові гени, введені транс генними рибами. Теоретично, ознаки нової риси зникнуть у наступних поколіннях.

2. Розповсюдження трансгену, якщо пристосованість трансгенної риби дорівнює або вища, ніж у її диких родичів, може створитися потік генів. Це означатиме збереження геном трансгенних риб у наступних поколіннях.

3) Сценарій Trojan Gen., у випадку коли пристосованість трансгенної риби зміниться так, що сприятиме успішному розмноженню, але зменшить життєздатність дорослих тарин. Введення цієї риби в дику природу може призвести до швидкого зниження чисельності популяцій місцевих риб [57]. По суті спільний успіх забезпечить поширення нового гену по усій популяції, але нездатність до виживання зменшить розмір популяцій у наступних поколіннях і потенційно призведе до вимирання. Зниження чисельності популяцій риби також матиме вторинний вплив на інші водні види, які живляться або залежать від нього іншим чином. Популяції, які не можуть успішно перейти на інше джерело харчування, або ті, чие виживання або розмноження безпосередньо залежатиме від скорочення популяції, також постраждають.

Навіть якщо трансгенні риби не розмножуються з дикими родичами, які потрапляють у природні екосистеми, вони можуть стати інвазивним видом. Ця небезпека виникає переважно для тих трансгенних риб, які отримали нові гени, що покращують здатність до розмноження та пристосованість до умов середовища (у тому числі, суворих умов). Створення успішної популяції трансгенних риб в екосистемі, де вона ніколи не існувала, може витіснити місцеві популяції.

Важливо відзначити, що розробники трансгенних риб намагаються зменшити або усунути як потік генів, так і ризики інвазивних видів шляхом стерилізації трансгенних риб. Однак, стерилізація не обов'язково нейтралізує екологічні ризики [59]. Було розроблено кілька підходів, які можуть зменшити ризики впливу ГМ риби на природу [60; 59]. Вони передбачають зменшення швидкості знаходження або виживання ГМ-риб у природі за допомогою фізичного та географічного утримання, обмеження генетичного потоку трансгену через індуковану стерильність та обмеження експресії трансгену у природі [59]. Біологічне утримання включає генетичний контроль, наприклад, шляхом отримання одностатевих нащадків [60; 61] або шляхом індукованої триплоїдії, яка спричиняє стерильність у багатьох видів риб. Досягнення 100 % стерильності за допомогою індукції триплоїдії виявилось складним завданням [62; 63].

Вчені FDA ретельно оцінили великі дані, представлені виробником, Aqua Bounty Technologies та інші рецензовані дані, щоб оцінити, чи відповідає лосось *Aqu Advantage* критеріям затвердження, встановленим законодавством; а саме, безпека та ефективність. Дані продемонстрували, що вставлені гени залишалися стабільними протягом декількох поколінь риб, що їжа з лосося GE безпечна для вживання людьми та тваринами, що генна інженерія безпечна для риб, а лосось відповідає вимогам спонсора про швидший ріст. Крім того, FDA оцінила вплив затвердження цієї заявки на навколишнє середовище та виявила, що схвалення не матиме значного впливу на навколишнє середовище США. Це пов'язано з тим, що багаторазові заходи стримування, які компанія буде застосовувати на наземних об'єктах в Панамі та Канаді, роблять надзвичайно мало ймовірним, що риба може врятуватися і утвердитися в дикій природі [58]. Використання лосося *Aqu Advantage* передбачає поєднання повністю жіночої триплоїдної технології з наземним фізичним утриманням у поєднанні з географічним обмеженням, з метою зменшення ризиків виживання. Таким чином, якщо самці відсутні, а самка врятувалась і виявилася не триплоїдною, то вона не зможе розмножуватись і передавати трансген наступному поколінню [58].

Багато регулюючих органів погоджуються з тим, що кожна ГМ-риба повинна пройти офіційний процес оцінки екологічного ризику до затвердження [55]. Нещодавно Європейський орган з безпеки харчових продуктів опублікував вичерпний керівний документ, що викладає вимоги щодо даних щодо ризику для ГМ-тварин, включаючи риб, які будуть виведені на європейський ринок (EFSA, 2013). Такі процеси оцінюють низку параметрів наслідків розвитку придатності та рибного господарства, які потім використовують для оцінки екологічного ризику, пов'язаного з вирощуванням ГМ-риб. Ці параметри включають (1) ймовірність втечі та випуску з вирощувального об'єкта в природу, (2) шкоду, пов'язану з самою рибою, і

(3) ризик, який вона створює, та наслідки, які вона може мати прямо чи опосередковано для екосистем в обох короткі та довгі терміни. Кожен із цих параметрів також пов'язаний з певним рівнем невизначеності [63]. Також бажано, щоб будь-яка діяльність за використання ГМ-риб була поєднана з системою моніторингу для оцінки потрапляння ГМ-тварин в природу і їх впливу на наколишне середовище, яке потенційно може бути пов'язане з вирощуванням ГМ-риб. Дані для оцінки екологічного ризику повинні базуватися на надійних наукових дослідженнях, які слід постійно продовжувати.

Висновки. Аквакультура залишається одним з найбільш швидкозростаючих секторів виробництва білків тваринного походження у всьому світі. Фактично, це єдине виробництво продукції тваринництва, яке зростає швидше, ніж населення землі, і цим забезпечує прийнятне доповнення і заміщення виловленої риби. Зі збільшенням попиту на продукти харчування, отриманих шляхом аквакультури, виникла потреба в більш ефективних технологічних системах, що переважають традиційні за прискореними темпами росту риби, ефективністю конверсії корму, зменшенням смертності від хвороб та пов'язаним з ним використанням хімікатів, низьким рівнем кисню, низькою плодючістю. Біотехнологія відкрила нові можливості для розвитку генетичних ресурсів аквакультури. завдяки розвитку генетичної інженерії. Починаючи з 1984 року методи введення чужинної генетичної інформації у геноми риби постійно вдосконалюються. Трансгенні риби створені з різною метою: 1) модельні системи в генетиці, біології розвитку, токсикології, фізіології, фармакології; 2) продуктивні тварини, що характеризуються швидким ростом, толерантністю до холоду, стійкістю до інфекцій; 3) риби-біореактори для експресії біохімічно важливих білків; 4) тестерніобекти для виявлення токсичності середовища; 5) декоративні лінії в акваріумістиці. Окрім наукових питань створення ГМ-риб із бажаними властивостями та підтримання цих ознак у рамках природного, статевого та штучного відбору, існують проблеми етичності, харчової безпечності, що поєднуються з економічними, соціальними та політичними питаннями.

HISTORY, CREATION AND USE OF TRANSGENIC FISH

*Kostenko S.O. – doctor of biological sciences, Professor,
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
svitlanakasijan@ukr.net*

Aquaculture remains one of the fastest growing sectors of animal protein production worldwide. With the increasing demand for aquaculture foods, there is a need for more efficient technological systems that outperform traditional accelerated fish growth rates, feed conversion efficiency, reduced disease mortality and associated

use of chemicals, low oxygen levels, and low oxygen levels. fertility. Biotechnology has opened up new opportunities for the development of genetic resources in aquaculture. The biotechnology of aquaculture facilities has received a new impetus due to the development of genetic engineering.

Fish have proved to be one of the most convenient animal objects of molecular biotechnology. This is due to their fertility, ability to external fertilization and development of embryos outside the mother. Transgenic fish are created for different purposes: 1) model systems in genetics, developmental biology, toxicology, physiology, pharmacology; 2) productive animals, characterized by rapid growth, tolerance to cold, resistance to infections 3) fish-bioreactors for the expression of biochemically important proteins; 4) tester facilities to detect environmental toxicity; 5) decorative lines in aquaristics.

With the development of genetic engineering, methods for creating transgenic fish and other aquaculture facilities have improved. There are currently several ways to produce transgenic fish, all of which involve the use of a transgenic construct with a promoter and a foreign gene. In the first stage, the foreign gene (transgene) transferred to the host organism is integrated into the vector, in the second stage, the gene is inserted into the host genome using a cloning vector. As vectors in the early stages used plasmids *E. coli*, which are able to replicate with high copying in host cells. The DNA sequence required for transfer was incorporated into the cloning (or expressing) vector by restriction enzymes to create complementary ends, as well as ligases to secure integration.

This time-consuming classical approach to cloning is ineffective because it is sometimes difficult to find restriction sites in the target DNA sequence. Today, other methods of cloning target DNA are used, which have speed advantages. Several different vectors are used to introduce transgenes into the fish genome: *E. coli* plasmids, bacterial artificial chromosomes (BAC), fosmids, retroviruses, and transposons.

Engineering of individual nucleases allows to induce double strand breaks (DSBs), which are then used for subsequent modifications. Three methods have been most widely used: 1) clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs); 2) transcription activator-like effector nucleases (TALENs); 3) zinc finger nucleases (ZFNs).

The development of GM fish has long sparked debate about the potential impact on the environment. The main environmental concerns about transgenic fish entering natural ecosystems relate to their competition with wild populations, transgenic migration to the wildlife gene pool, and the environmental changes they cause.

Keywords: aquaculture, genetically modified fish, transgenesis, ecological risks.

ЛІТЕРАТУРА

1. FAO-веб-сайт. URL: <http://www.fao.org/fisheries/ru/>.
2. ФАО. 2017. веб-сайт. URL: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB_2017_USBcard/navigation/index_intro_f.htm (дата звернення: 09.09.2020)
3. ФАО. 2020. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры – 2020. Меры по повышению устойчивости. Рим, ФАО. Веб-сайт. URL: <http://www.fao.org/3/ca9229ru/CA9229RU.pdf> (дата звернення: 12.09.2020).
4. Tonelli F. M. P., Lacerda S. M. S. N., Tonelli F. C. P., Costa G. M. J., de França L. R., Resende R. R. (2017). Progress and biotechnological prospects

- in fish transgenesis. *Biotechnology Advances*. Vol. 35. № 6. 832–844. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.06.002.
5. Omole I.A. (2017). Biotechnology as an Important Tool for Improving Fish Productivity, *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 5, № 1. 17–22. doi: 10.11648/j.bio.20170501.14
 6. Dunham R.A., Majumdar K., Hallerman E., Bartley D., Mair G., Hulata G., Liu Z., Pongthana N., Bakos J., Penman D., Gupta M., Rothlisberg P. and Hoerstgen-Schwark G. (2001). Review of the Status of Aquaculture Genetics. In: Subasinghe, R. P. Bueno, P. Phillips, M. J. Hough C., McGladdery S. E. and Arthur J. R. (eds) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millenium, Bangkok, Thailand, 20–25 February. NACA, Bangkok, and FAO, Rome. 129–157.
 7. Ayoola, S.O. and Idowu, A.A. (2008). Biotechnology and Species Development in Aquaculture. *African Journal of Biotechnology*. Vol.25. № 7. P. 4722–4725.
 8. Dunham R.A. (2004). Aquaculture and Fisheries Biotechnology – Genetic Approaches. CABI Publishing. 372.
 9. Nwokwa M.C. (2012). The Review of Recent Advances inFish Genetics and Biotechnology. *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 6. № 1. 9–18.
 10. Arai K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*. Vol. 197. 205–228.
 11. Maclean N., Penman D., Zhu Z. (1987). Introduction of novel gene into fish. *Bio/Technology*. Vol. 5. 257–261.
 12. Zhu Z., Li G., He L., Chen S. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *J. Appl. Ichthyol*. Vol. 1. 31–34.
 13. Zhu Z., Xu K., Li G., Xie Y., He L. (1986). Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach, *Misgurnusanguillicaudatus* (Cantor). *KexueTongbao, Acad. Sin*. Vol. 31. 988–990.
 14. Zhu Z., He L., Chen T.T. (1992). Primary-structural and evolutionary analyses of growth-hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodonidellus*). *Eur. J. Biochem*. Vol. 207. 643–648.
 15. Wang Y., Hu W., Wu G., Sun Y., Chen S., Zhang F., Zhu Z., Feng J., Zhang X. (2001). Genetic analysis of “all-fish” growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. *Chin. Sci. Bull*. Vol. 46. 1174–1177.
 16. Hwang G, Müller F, Rahman MA, et al. (2004). Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar Biotechnol* (NY). Vol. 5. № 6. 485–492. doi:10.1007/s10126-004-3121-2

17. Richard N. Winn (2001). Transgenic Fish as Models in Environmental Toxicology. *ILAR Journal*. Vol. 42. № 4. 322–329. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.4.322>
18. Gong Z., Ju B., Wan H. (2001). Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica*. Vol. 111. 213–225.
19. Gong Z., Wan H., Tay TL., Wang H., Chen M., Yan T. (2003). Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *BiochemBioph Res Co*. Vol. 308. 58–63.
20. Marsischky G. Many (2004). Paths to Many Clones: A Comparative Look at High-Throughput Cloning Methods. *Genome Research*. Vol. 14. 2020–2028. doi:10.1101/gr.2528804
21. Lee O., Green J.M., Tyler C.R. (2014). Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 45. № 2. 124–141. doi:10.3109/10408444.2014.965805
22. Kim KH, Park HJ, Kim JH, et al. (2013). Cypla reporter zebrafish reveals target tissues for dioxin. *Aquat Toxicol*. Jun 15; 134–135:57–65. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.010
23. Trinh L.A., Fraser, S.E. (2013). Enhancer and gene traps for molecular imaging and genetic analysis in zebrafish. *Development, growth & differentiation*. Vol. 55. № 4. 434–45.
24. Ellingsen S, Laplante M.A., König M., Kikuta H., Furmanek T., Hoivik E.A., Becker T.S. (2005). Large-scale enhancer detection in the zebrafish genome. *Development*. Vol. 132. 3799–3811; doi: 10.1242/dev.01951
25. Chen W., Burgess S., Golling G., Amsterdam A., Hopkins N. (2002). High-throughput selection of retrovirus producer cell lines leads to markedly improved efficiency of germ line-transmissible insertions in zebrafish. *J Virol*, Vol. 76. 2192–2198.
26. Wang D., Jao L.E., Zheng N., Dolan K., Ivey J., Zonies S., et al. (2007). Efficient genome-wide mutagenesis of zebrafish genes by retroviral insertions. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 104. 12428–12433.
27. Kawakami K., Takeda H., Kawakami N., Kobayashi M., Matsuda N., Mishina M. (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebra fish. *Dev Cell*. Vol. 7. 133–144.
28. Hamlet M.R., Yergeau D.A., Kuliyeve E., Takeda M., Taira M., Kawakami K., Mead P.E. (2006). Tol2 transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*. Vol. 44. 438–445.
29. Asakawa K., Kawakami K. (2009). The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebra fish. *Methods*. Vol. 49. 275–281.
30. Miskey C., Izsvak Z., Kawakami K., Ivics I. (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell Mollife Sci*. Vol. 62. 629–641.

31. Davidson A., Balciunas D., Mohn D., Shaffer J., Hermanson S., Sivasubbu S. et al. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev Biol.* Vol. 263. 191–202.
32. Grabher C., Wittbrodt J. (2008). Recent advances in meganuclease-and transposon-mediated transgenesis of medaka and zebrafish. *Methods Mol Biol.* Vol. 461. 521–539.
33. Kirchmaier S., Hockendorf B., Moller E.K., Bornhorst D., Spitz F., Wittbrodt J. (2013). Efficient site-specific transgenesis and enhancer activity tests in medaka using PhiC31 integrase. *Development.* Vol. 140. 4287–4295.
34. Ishikawa T., Ansai S., Kinoshita M., Mori K. (2018). A Collection of Transgenic Medaka Strains for Efficient Site-Directed Transgenesis Mediated by phiC31 Integrase. G3: GENES, GENOMES, GENETICS, August 1, 2018 Vol. 8. № 8. 2585–2593. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200130>
35. Roberts J.A., Miguel-Escalada I., Slovik K.J., Walsh K.T., Hadzhiev Y., Sanges R., et al. (2014). Targeted transgene integration overcomes variability of position effects in zebrafish. *Development.* Vol. 141. 715–724.
36. Han H.A., Pang J.K.S., Soh B. (2020). Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing. *J Mol Med.* Vol. 98. 615–632. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01893-z>
37. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D. et al. (2013). Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One.* Jul 9. Vol. 8. № 7. doi: 10.1371/journal.pone.0068708.
38. Auer T.O., Duroure K., Cian A.D., Concordet J.P., Bene F.D. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* Vol. 24. 142–153.
39. Distel M., Wullimann M.F., Koster R.W. (2009). Optimized Gal4 genetics for permanent gene expression mapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 106. 13365–13370.
40. Joung J.K., Sander J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 14. 49–55.
41. Boch J., Bonas U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* Vol. 48. 419–436.
42. Hwang W.Y., Peterson R.T., Yeh J.R. (2014). Methods for targeted mutagenesis in zebrafish using TALENs. *Methods*, Vol. 69. 76–84.
43. Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D., Joung J.K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol.* Vol. 30. 460–465.
44. Hartley K.O., Nutt S.L., Amaya E. (2002). Targeted gene expression in transgenic *Xenopus* using the binary Gal4-UAS system. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 99. 1377–1382.

45. Duffy J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. Vol. 34. 1–15.
46. Kramer J.M., Staveley B.E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res*. Vol. 2. 43–47.
47. Lee O., Takesono A., Tada M., Tyler C.R., Kudoh T. (2012). Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens. *Environ Health Perspect*. Vol. 120. 990–996.
48. Goll M.G., Anderson R., Stainier D.Y., Spradling A.C., Halpern M.E. (2009). Transcriptional silencing and reactivation in transgenic zebrafish. *Genetics*. Vol. 182. 747–755.
49. Akitake C.M., Macurak M., Halpern M.E., Goll M.G. (2011). Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish. *Dev Biol*. Vol. 352. 191–201.
50. Suli A., Guler A.D., Raible D.W., Kimelman D. (2014). A targeted gene expression system using the tryptophan repressor in zebrafish shows no silencing in subsequent generations. *Development*. Vol. 141. 1167–1174.
51. Subedi A., Macurak M., Gee S.T., Monge E., Goll M.G., Potter C.J. et al. (2013). Adoption of the Q transcriptional regulatory system for zebrafish transgenesis. *Methods*. Vol. 66. 433–440.
52. Maclean N., Laight, R.J. (2000). Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries*. Vol. 1. № 2. 146–172. doi:10.1046/j.1467-2979.2000.00014.x
53. Sundström L., Devlin R. (2015). Ecological implications of genetically modified fishes in freshwater fisheries, with a focus on salmonids. In Craig J.F. (eds.) Wiley-Blackwell, Ltd. 2015. P. 594-615. <https://doi.org/10.1002/9781118394380.ch46>
54. Tiedje J.M., Colwell R.K., Grossman Y.L., Hodson R.E., Lenski, R.E., Mack R.N., Regal P.J. (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*. 70. 298–315.
55. Kapuscinski A.R., Hallerman E.M. (1990). Transgenic fish and public policy: anticipating environmental impacts of transgenic fish. *Fisheries*. Vol. 15. 2–11.
56. Jeschke J. M., Keesing F., Ostfeld R.S. (2013). Novel organisms: comparing invasive species, GMOs, and emerging pathogens. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. Vol. 42. 541–548.
57. William M. Muir and Richard D. Howard Transgenic fish could threaten wild populations. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan

- gene hypothesis. URL: <https://www.purdue.edu/uns/html4ever/0002.Muir.trojan.html> (дата звернення: 09.09.2020)
58. FDA веб-сайт. URL: <https://web.archive.org/web/20151119162500/https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm472487.htm> ("FDA Has Determined That the AquAdvantage Salmon is as Safe to Eat as Non-GE Salmon". *U.S. Food & Drug Administration*. 2015-11-19. Archived from the original on 2015-11-19.) (дата звернення: 09.09.2020).
59. Mair G. C., Nam Y. K., Solar I. I. (2007). Risk management: reducing risk through confinement of transgenic fish. In *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organism*, Vol. 3 (Kapusinski A. R., Hayes K.R., Li S., Dana G., eds). 209–238. Abingdon: CAB International.
60. Devlin R.H., Donaldson E.M. (1992). Containment of genetically altered fish with emphasis on salmonids. In *Transgenic Fish* (Hew, C. L., Fletcher, G. L., eds). 229–265. Singapore: World Scientific Publishers.
61. Abad Z., Gonzalez R., Mendoza I., Oliva A., Pimentel E., Pimentel R., Martinez R., Estrada M. P., Ramirez, Y., Arenal A. (2007). Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using *Oreochromis aureus* ZZ selected pseudofemales. *Aquaculture*. Vol. 270. № 1–4. 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.035>.
62. Razak S.A., Hwang G.L., Rahman, M.A., Maclean N. (1999). Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heat shock induced triploidy. *Marine Biotechnology*. Vol. 1. 533–544.
63. Devlin R.H., Sakhrani D., Biagi C.A., Eom K.W. (2010). Occurrence of incomplete paternal chromosome retention in GH transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure shock induced triploidy. *Aquaculture*. Vol. 304. 66–78.

REFERENCES

1. FAO веб-сайт. URL: <http://www.fao.org/fisheries/ru/> (дата звернення: 09.09.2020).
2. ФАО. 2017. веб-сайт. URL: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/navigation/index_intro_f.htm<http://www.fao.org/fisheries/ru/> (дата звернення: 09.09.2020)
3. ФАО. 2020. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры – 2020. Меры по повышению устойчивости. Рим, ФАО. <https://doi.org/10.4060/ca8642ru> : веб-сайт. URL: <http://www.fao.org/3/ca9229ru/CA9229RU.pdf> (дата звернення: 12.09.2020).
4. Tonelli F. M. P., Lacerda S. M. S. N., Tonelli F. C. P., Costa G. M. J., de França L. R., Resende R. R. (2017). Progress and biotechnological prospects

- in fish transgenesis. *Biotechnology Advances*. Vol. 35. № 6. 832–844. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.06.002.
5. Omole I.A. (2017). Biotechnology as an Important Tool for Improving Fish Productivity, *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 5, № 1. 17–22. doi: 10.11648/j.bio.20170501.14
 6. Dunham R.A., Majumdar K., Hallerman E., Bartley D., Mair G., Hulata G., Liu Z., Pongthana N., Bakos J., Penman D., Gupta M., Rothlisberg P. and Hoerstgen-Schwark G. (2001). Review of the Status of Aquaculture Genetics. In: Subasinghe, R. P. Bueno, P. Phillips, M. J. Hough C., McGladdery S. E. and Arthur J. R. (eds) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millenium, Bangkok, Thailand, 20–25 February. NACA, Bangkok, and FAO, Rome. 129–157.
 7. Ayoola, S.O. and Idowu, A.A. (2008). Biotechnology and Species Development in Aquaculture. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 25. № 7. P. 4722–4725.
 8. Dunham R.A. (2004). Aquaculture and Fisheries Biotechnology – Genetic Approaches. CABI Publishing. 372.
 9. Nwokwa M.C. (2012). The Review of Recent Advances in Fish Genetics and Biotechnology. *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 6. № 1. 9–18.
 10. Arai K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*. Vol. 197. 205–228.
 11. Maclean N., Penman D., Zhu Z. (1987). Introduction of novel gene into fish. *Bio/Technology*. Vol. 5. 257–261.
 12. Zhu Z., Li G., He L., Chen S. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *J. Appl. Ichthyol*. Vol. 1. 31–34.
 13. Zhu Z., Xu K., Li G., Xie Y., He L. (1986). Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Kexue Tongbao, Acad. Sin.* Vol. 31. 988–990.
 14. Zhu Z., He L., Chen T.T. (1992). Primary-structural and evolutionary analyses of growth-hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Eur. J. Biochem*. Vol. 207. 643–648.
 15. Wang Y., Hu W., Wu G., Sun Y., Chen S., Zhang F., Zhu Z., Feng J., Zhang X. (2001). Genetic analysis of “all-fish” growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. *Chin. Sci. Bull*. Vol. 46. 1174–1177.
 16. Hwang G, Müller F, Rahman MA, et al. (2004). Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar Biotechnol* (NY). Vol. 5. № 6. 485–492. doi:10.1007/s10126-004-3121-2

17. Richard N. Winn (2001). Transgenic Fish as Models in Environmental Toxicology. *ILAR Journal*. Vol. 42. № 4. 322–329. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.4.322>
18. Gong Z., Ju B., Wan H. (2001). Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica*. Vol. 111. 213–225.
19. Gong Z., Wan H., Tay TL., Wang H., Chen M., Yan T. (2003). Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *BiochemBioph Res Co*. Vol. 308. 58–63.
20. Marsischky G. Many (2004). Paths to Many Clones: A Comparative Look at High-Throughput Cloning Methods. *Genome Research*. Vol. 14. 2020–2028. doi:10.1101/gr.2528804
21. Lee O., Green J.M., Tyler C.R. (2014). Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 45. № 2. 124–141. doi:10.3109/10408444.2014.965805
22. Kim KH, Park HJ, Kim JH, et al. (2013). Cypla reporter zebrafish reveals target tissues for dioxin. *Aquat Toxicol*. Jun 15; 134–135:57–65. doi:10.1016/j.aquatox.2013.03.010
23. Trinh L.A., Fraser, S.E. (2013). Enhancer and gene traps for molecular imaging and genetic analysis in zebrafish. *Development, growth & differentiation*. Vol. 55. № 4. 434–45.
24. Ellingsen S, Laplante M.A., König M., Kikuta H., Furmanek T., Hoivik E.A., Becker T.S. (2005). Large-scale enhancer detection in the zebrafish genome. *Development*. Vol. 132. 3799–3811; doi: 10.1242/dev.01951
25. Chen W., Burgess S., Golling G., Amsterdam A., Hopkins N. (2002). High-throughput selection of retrovirus producer cell lines leads to markedly improved efficiency of germ line-transmissible insertions in zebrafish. *J Virol*, Vol. 76. 2192–2198.
26. Wang D., Jao L.E., Zheng N., Dolan K., Ivey J., Zonies S., et al. (2007). Efficient genome-wide mutagenesis of zebrafish genes by retroviral insertions. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 104. 12428–12433.
27. Kawakami K., Takeda H., Kawakami N., Kobayashi M., Matsuda N., Mishina M. (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebra fish. *Dev Cell*. Vol. 7. 133–144.
28. Hamlet M.R., Yergeau D.A., Kuliyeve E., Takeda M., Taira M., Kawakami K., Mead P.E. (2006). Tol2 transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*. Vol. 44. 438–445.
29. Asakawa K., Kawakami K. (2009). The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebra fish. *Methods*. Vol. 49. 275–281.
30. Miskey C., Izsvak Z., Kawakami K., Ivics I. (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell MolLife Sci*. Vol. 62. 629–641.

31. Davidson A., Balciunas D., Mohn D., Shaffer J., Hermanson S., Sivasubbu S. et al. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev Biol.* Vol. 263. 191–202.
32. Grabher C., Wittbrodt J. (2008). Recent advances in meganuclease-and transposon-mediated transgenesis of medaka and zebrafish. *Methods Mol Biol.* Vol. 461. 521–539.
33. Kirchmaier S., Hockendorf B., Moller E.K., Bornhorst D., Spitz F., Wittbrodt J. (2013). Efficient site-specific transgenesis and enhancer activity tests in medaka using PhiC31 integrase. *Development.* Vol. 140. 4287–4295.
34. Ishikawa T., Ansai S., Kinoshita M., Mori K. (2018). A Collection of Transgenic Medaka Strains for Efficient Site-Directed Transgenesis Mediated by phiC31 Integrase. G3: *GENES, GENOMES, GENETICS*, August 1, 2018. Vol. 8. № 8. 2585–2593. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200130>
35. Roberts J.A., Miguel-Escalada I., Slovik K.J., Walsh K.T., Hadzhiev Y., Sanges R., et al. (2014). Targeted transgene integration overcomes variability of position effects in zebrafish. *Development.* Vol. 141. 715–724.
36. Han H.A., Pang J.K.S., Soh B. (2020). Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing. *J Mol Med.* Vol. 98. 615–632. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01893-z>
37. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D. et al. (2013). Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One.* Jul 9. Vol. 8. № 7. doi: 10.1371/journal.pone.0068708.
38. Auer T.O., Durore K., Cian A.D., Concordet J.P., Bene F.D. (2014). Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* Vol. 24. 142–153.
39. Distel M., Wullimann M.F., Koster R.W. (2009). Optimized Gal4 genetics for permanent gene expression mapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 106. 13365–13370.
40. Joung J.K., Sander J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 14. 49–55.
41. Boch J., Bonas U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* Vol. 48. 419–436.
42. Hwang W.Y., Peterson R.T., Yeh J.R. (2014). Methods for targeted mutagenesis in zebrafish using TALENs. *Methods*, Vol. 69. 76–84.
43. Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D., Joung J.K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol.* Vol. 30. 460–465.
44. Hartley K.O., Nutt S.L., Amaya E. (2002). Targeted gene expression in transgenic *Xenopus* using the binary Gal4-UAS system. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 99. 1377–1382.

45. Duffy J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. Vol. 34. 1–15.
46. Kramer J.M., Staveley B.E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res*. Vol. 2. 43–47.
47. Lee O., Takesono A., Tada M., Tyler C.R., Kudoh T. (2012). Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens. *Environ Health Perspect*. Vol. 120. 990–996.
48. Goll M.G., Anderson R., Stainier D.Y., Spradling A.C., Halpern M.E. (2009). Transcriptional silencing and reactivation in transgenic zebrafish. *Genetics*. Vol. 182. 747–755.
49. Akitake C.M., Macurak M., Halpern M.E., Goll M.G. (2011). Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish. *Dev Biol*. Vol. 352. 191–201.
50. Suli A., Guler A.D., Raible D.W., Kimelman D. (2014). A targeted gene expression system using the tryptophan repressor in zebrafish shows no silencing in subsequent generations. *Development*. Vol. 141. 1167–1174.
51. Subedi A., Macurak M., Gee S.T., Monge E., Goll M.G., Potter C.J. et al. (2013). Adoption of the Q transcriptional regulatory system for zebrafish transgenesis. *Methods*. Vol. 66. 433–440.
52. Maclean N., Laight, R.J. (2000). Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries*. Vol. 1. № 2. 146–172. doi:10.1046/j.1467-2979.2000.00014.x
53. Sundström L., Devlin R. (2015). Ecological implications of genetically modified fishes in freshwater fisheries, with a focus on salmonids. In Craig J.F. (eds.) Wiley-Blackwell, Ltd. 2015. P. 594-615. <https://doi.org/10.1002/9781118394380.ch46>
54. Tiedje J.M., Colwell R.K., Grossman Y.L., Hodson R.E., Lenski, R.E., Mack R.N., Regal P.J. (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*. 70. 298–315.
55. Kapuscinski A.R., Hallerman E.M. (1990). Transgenic fish and public policy: anticipating environmental impacts of transgenic fish. *Fisheries*. Vol. 15. 2–11.
56. Jeschke J. M., Keesing F., Ostfeld R.S. (2013). Novel organisms: comparing invasive species, GMOs, and emerging pathogens. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. Vol. 42. 541–548.
57. William M. Muir and Richard D. Howard Transgenic fish could threaten wild populations. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan

- gene hypothesis. URL: <https://www.purdue.edu/uns/html4ever/0002.Muir.trojan.html> (дата звернення: 09.09.2020)
58. FDA веб-сайт. URL: <https://web.archive.org/web/20151119162500/https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm472487.htm> ("FDA Has Determined That the AquAdvantage Salmon is as Safe to Eat as Non-GE Salmon". *U.S. Food & Drug Administration*. 2015-11-19. Archived from the original on 2015-11-19.) (дата звернення: 09.09.2020).
59. Mair G. C., Nam Y. K., Solar I. I. (2007). Risk management: reducing risk through confinement of transgenic fish. In *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organism*, Vol. 3 (Kapusinski A. R., Hayes K.R., Li S., Dana G., eds). 209–238. Abingdon: CAB International.
60. Devlin R.H., Donaldson E.M. (1992). Containment of genetically altered fish with emphasis on salmonids. In *Transgenic Fish* (Hew, C. L., Fletcher, G. L., eds). 229–265. Singapore: World Scientific Publishers.
61. Abad Z., Gonzalez R., Mendoza I., Oliva A., Pimentel E., Pimentel R., Martinez R., Estrada M. P., Ramirez, Y., Arenal A. (2007). Production of a high percentage of male offspring in growth-enhanced transgenic tilapia using *Oreochromis aureus* ZZ selected pseudofemales. *Aquaculture*. Vol. 270. № 1–4. 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.035>.
62. Razak S.A., Hwang G.L., Rahman, M.A., Maclean N. (1999). Growth performance and gonadal development of growth enhanced transgenic tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) following heat shock induced triploidy. *Marine Biotechnology*. Vol. 1. 533–544.
63. Devlin R.H., Sakhrani D., Biagi C.A., Eom K.W. (2010). Occurrence of incomplete paternal chromosome retention in GH transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure shock induced triploidy. *Aquaculture*. Vol. 304. 66–78.