

## АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ *CHD* ЯК МОДЕЛЬНОГО ОБ'ЄКТУ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО СЕКСУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ ВИДУ ПУГАЧ ЗВИЧАЙНИЙ (*BUBO BUBO*)

Р.О. КУЛІБАБА<sup>1</sup>, Ю.В. ЛЯШЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони 15, Київ, 03041, Україна

<sup>2</sup> Інститут тваринництва НААН України, вул. Тваринників 1-А, Харків, 61026, Україна

E-mail: romankx37@gmail.com

Проведено дослідження поліморфізму гену *CHD*, як модельного об'єкту для молекулярного сексування представників виду *Bubo bubo* (пугач звичайний). Проаналізовано методи класичної ПЛР для ампліфікації цільових фрагментів гену *CHD* з використанням маркерних систем P2/P8, 2550F/2718R та 1237L/1272H; рестрикційного (PCR-RFLP) і гетеродуплексного методичних підходів. Показано, що використання маркерної системи P2/P8 у рамках класичної ПЛР дає можливість ефективно проводити сексування птахів тільки за умов електрофоретичного розподілу фрагментів у поліакриламідному гелі. При використанні маркерів 2550F/2718R й 1237L/1272H виявлено їх недостатню ефективність як в агарозному, так й у поліакриламідному гелях, внаслідок неможливості диференціювання генотипів *CHD<sup>ZZ</sup>* та *CHD<sup>WW</sup>*. Доведено наявність поліморфного сайту рестрикції для *HaeIII* у ампліфікованих, за використання праймерів P2/P8, фрагментах *CHD<sup>Z</sup>* та *CHD<sup>W</sup>*. Для ендонуклеази рестрикції *DdeI* поліморфного сайту не виявлено. Доведено високу ефективність використання гетеродуплексного аналізу на основі маркерів P2/P8 для сексування особин при електрофоретичному розподілі ампліфікованих фрагментів як у поліакриламідному, так і в агарозному гелях. У випадку експериментальних зразків, що містять амплікони *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>*, виявлено додаткові фрагменти гетеродуплексної ДНК, наявність яких дозволяє безпомилково визначити генотип птаці.

**Ключові слова:** *Strigidae*, *Bubo bubo*, поліморфізм, сексування, полімеразна ланцюгова реакція, рестрикція, гетеродуплекси.

**Вступ.** Пугач (*Bubo*) — рід птахів із родини Совових (*Strigidae*), що нараховує 19 видів. Це соціально моногамні, довго живучі й немігруючі види, які практично не мають природних ворогів і демонструють досить високий рівень життєздатності (Leyn-Ortega et al, 2017). Проте, подібно іншим хижим птахам, які пе-

ребувають на верхівці екосистеми, вони досить уразливі перед впливом факторів (переважно антропогенних), що призводять до руйнування їхнього середовища існування. Особливо гостро ця проблема проявляється у зв'язку із природною низькою щільністю населення пугачів (Penteriani et al, 2006). Як результат, у теперішній час деякі види знаходяться під загрозою вимирання (Пугач далекосхідний *B. blakistoni*), або можуть стати рідкісними й дуже вразливими у найближчому майбутньому (Пугач філіппінський *B. philippensis*, Сова біла *B. scandiacus*, Пугач смугастий *B. shelleyi*). На жаль, до цієї групи зі скорочуваною чисельністю належить і Пугач звичайний (*Bubo bubo*) — одна із найбільших і величних сов у світі дикої природи.

Поряд з різними проблемами щодо практичної генетики птаці, визначення статі відноситься до важливих питань екології і біології пернатих (Krüger, 2005). Безпомилкове визначення статі (сексування) особин також належить до критично важливої інформації для програм збереження генетичних ресурсів і підтримки біологічного різноманіття рідкісних видів (Griffiths et al, 1995), вирішення проблеми ефективності розмноження птахів у неволі (Miyaki et al, 1998), питань комерційного утримання декоративних і хижих птахів.

Більшість хижих видів птахів мають диморфний розмір тіла, що дозволяє розробляти методи визначення статі на основі морфологічних параметрів (промірів). Існують приклади ефективної обробки даних за допомогою морфометричних таблиць, дискримінантної функції (Delgado et al, 2004) і логістичної регресії (Tornberg et al, 2016). Точність класифікації на основі цих моделей досягає 90–95 %, однак вони розроблені для конкретних ареалів перебування й мало придатні для застосуван-

ня у польових умовах, що істотно обмежує область їх використання. З розробкою молекулярно-генетичних методів, заснованих безпосередньо на аналізі спадкового матеріалу (ДНК), проблема визначення статі птахів знайшла своє практичне вирішення.

Відкриття на W-хромосомі пашиного гомолога гена, що кодує хромодомен-хеліказа-ДНК зв'язуючий білок (хромохеліказа-ДНК-зв'язуючий білок 1, *CHD*), раніше описаного у ссавців (Ellegren, 1996), істотно полегшило завдання з молекулярно-генетичного визначення статі. За результатами чисельних досліджень виявлені розходження у довжині окремих інтронних областей *CHD* гену між W й Z хромосомами. Для детекції варіантів гену *CHD* розроблені три найбільш розповсюджені на даний момент праймерні системи: праймери 2550F/2718R (Fridolfsson et al, 1999), P2/P8 (Griffiths et al, 1998) та 1237L/1272H (Kahn et al, 1998). До найбільш популярних праймерних систем, які найчастіше використовуються у практичній діяльності і забезпечують максимально широке охоплення різних видів безкілевих птахів, відносяться, у першу чергу, P2/P8 та 2550F/2718R (Mataragka et al, 2020).

Праймери розроблені для консервативних ділянок *CHD*, що дозволяє успішно ампліфікувати цільові фрагменти для більшості видів птахів з використанням стандартних умов електрофоретичного розподілу (Barros et al, 2017; Medeiros et al, 2019). Успішно проведено сексування і деяких видів родини Совових: *Tyto alba javanica* – з використанням праймерів 2718R/2550F і P2/P8 (Ravindran et al, 2018; Ravindran et al, 2019); *Bubo scandiacus* – з використанням P2/P8 (Seidensticker et al, 2011); *Otus bakkamoena* – з використанням праймерів, розроблених на основі RAPD (Wang et al, 2013). Незважаючи на позитивні результати досліджень для представників ряду Совоподібні, дані з успішного сексування *Bubo bubo* не дають можливості визначити максимально ефективний метод типування – для окремих видів ряду *Strigiformes* проблему на даному етапі повністю не вирішено, в першу чергу внаслідок «недостатньо вираженого» поліморфізму між *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>* ампліконами (Wang et al, 2008; Sakmak et al, 2017). Для вирішення

цього питання використовують інші методичні підходи – показана ефективність використання методу одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) для сексування *Bubo bubo* (Corte's et al, 1999), проводяться дослідження з розробки альтернативних праймерних систем (Lee et al, 2008). До потенційно перспективних належить метод PCR-RFLP з ендонуклеазами рестрикції DdeI та HaeIII, що успішно використовується для сексування багатьох видів птахів (*Ara ararauna*, *Circaetus gallicus* і т.д.), при визначенні статі яких виникають певні труднощі, пов'язані з недостатньо вираженими розходженнями в розмірах досліджуваних ділянок гену *CHD* (Griffiths et al, 1996; Griffiths et al, 1998; Ellegren, 1996; Bermudez-Humaran et al, 2002; Sacchi et al, 2004). Особливої уваги заслуговує питання використання гетеродуплексного аналізу, що на сьогодні практично не застосовується для вирішення проблеми визначення статі птахів.

З огляду на вищенаведене, у наших дослідженнях поставлено завдання за використання різних молекулярно-генетичних маркерних систем визначити особливості поліморфізму гену *CHD* як модельного об'єкту для сексування представників виду *Bubo bubo*.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведені в лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва Національної академії аграрних наук України.

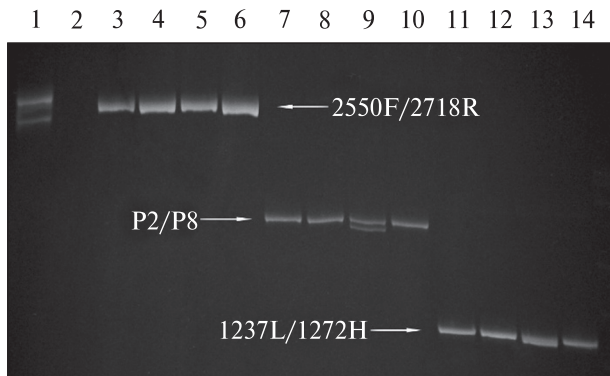
В якості об'єкта досліджень використовували особин Пугача звичайного (*Bubo bubo*) обох статей ( $n = 18$ ). Як джерело біологічного матеріалу використовували пір'я особин, які розводяться в умовах зоопарків і екопарків України. Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного набору реагентів «ДНК-Сорб-В» («Амплиценс», РФ) відповідно до протоколів виробника (<https://interlabservice.ru/upload/iblock/318/DNA-sorb-B%20221217.pdf>

Для проведення ПЛР використовували наступні олігонуклеотиди:

P2/P8 – tctgcatcgctaaatccttt, ctcccaaggatgagraaytg (Griffiths et al, 1998);

2550F/2718R – gttactgattctctacgaga, attgaaatgattccagtcttg (Fridolfsson et al, 1999);

1237L/1272H – gagaaactgtgcaaaacag, tccagaatatcttctctcc (Kahn et al, 1998).



**Рис. 1.** Електрофореграма ампліфікованих фрагментів гену *CHD* за використання праймерів 2550F/2718R; P2/P8 і 1237L/1272H у поліакриламідному гелі. 1–14 – номери зразків; 1 – маркер молекулярних мас (600 та 580 п.н.); 2 – негативний контрольний зразок; 3–6 – праймери 2550F/2718R; 7–10 – праймери P2/P8; 11–14 – праймери 1237L/1272H

Ампліфікацію проводили за відповідними для кожної маркерної системи програмами: один цикл – денатурація 94 °С 1 хв 30 с; 30 циклів – денатурація 94 °С 30 с, відпал 45 с (48 °С для P2/P8 і 2550F/2718R; 56 °С для 1237L/1272H), елонгація 72 °С 45 с; фінальна елонгація – 72 °С 10 хв. Об'єм кінцевої суміші склав 20 мкл, концентрація праймерів – 0,2 мкМ.

Рестрикцію проводили з використанням ендонуклеаз рестрикції *HaeIII* та *DdeI* («Thermo Fisher Scientific», США) відповідно до протоколів виробника.

Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли в агарозних (1,5–3 %) гелях за напруги 150 В упродовж 40 хв та у поліакриламідних (6 %) нативних гелях за напруги 250 В упродовж 180 хв.

Візуалізацію фрагментів ДНК проводили з використанням бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** На першому етапі досліджень вивчено ефективність застосування різних типів праймерних систем (P2/P8, 2550F/2718R і 1237L/1272H) для типування особин *Bubo bubo*.

Використання «класичного» підходу, тобто сексування особин шляхом проведення стандартної ПЛР з наступним розподілом ампліконів (за різних праймерних систем) в агароз-

ному і поліакриламідному гелях призвело до різних результатів у кожному з аналізованих випадків. За результатами досліджень, представників виду *Bubo bubo* вдалося ефективно сексувати тільки за використання праймерів P2/P8 з наступним розподілом ампліфікованих фрагментів у поліакриламідному гелі (рис. 1).

На представленому рисунку зразки дублюють один одного залежно від типу використуваних маркерів. У випадку із праймерами 2550F/2718R спостерігається повністю гомогенна картина – поліморфізм відсутній, що не дає можливості їхнього використання в якості інструменту типування. У свою чергу при ампліфікації у системі 1237L/1272H з наступним розділенням у поліакриламідному гелі ми спостерігаємо розбіжності між зразками. У зразку № 13 у наявності два ампліфікованих фрагмента, що вказує на генотип *CHD<sup>ZW</sup>* (самка). Інші зразки визначені як генотип *CHD<sup>ZZ</sup>*. Результати, отримані з використанням маркерів 1237L/1272H, повністю збігаються з такими для P2/P8 – три особини з генотипом *CHD<sup>ZZ</sup>* й одна з *CHD<sup>ZW</sup>*. Проте, між маркерами є істотні розходження. Фрагменти *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>* зразка з генотипом *CHD<sup>ZW</sup>* для 1237L/1272H розрізняються недостатньо виражено порівняно з такими при використанні маркера P2/P8, що може призводити до плутанини внаслідок неможливості їхнього диференціювання на електрофореграмі. Звичайно, у цьому випадку можна збільшити тривалість процедури електрофорезу, однак це суттєво ускладнює генотипування й не дозволяє використовувати метод як рутинний інструмент у лабораторній практиці.

Слід зазначити, що Kahn N. зі співавторами вказують на низьку ефективність визначення статі деяких видів птахів родини *Strigidae* (*Bubo virginianus*) з використанням праймерів 1237L/1272H також внаслідок недостатньо вираженого поліморфізму гену *CHD* у представників обох статей, що повністю підтверджується результатами наших досліджень.

Для порівняння ефективності використаня різних типів гелів для розподілу ампліфікованих фрагментів проведено дослідження з застосуванням агарози. Електрофореграму ампліфікованих фрагментів гену *CHD* на при-

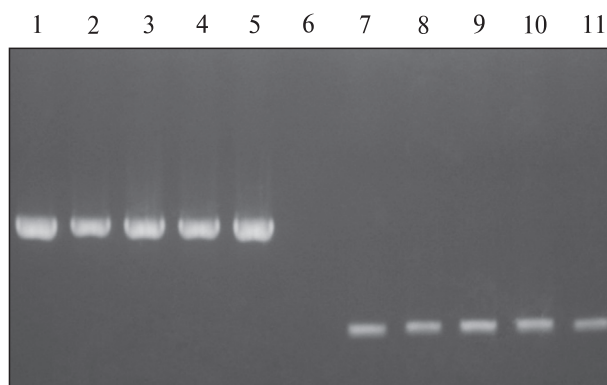
кладі маркерів 2550F/2718R й P2/P8 в агарозному гелі представлено на рис. 2.

Використання всіх трьох типів аналізованих маркерів в агарозних гелях не дає змоги успішно генотипувати особин внаслідок відсутності виражених відмінностей між ампліконами. У кожному з розглянутих випадків різні генотипи *CHD<sup>zz</sup>* й *CHD<sup>w</sup>* представлені у вигляді одного фрагменту, що вказує на неможливість виявлення поліморфізму в досліджуваному локусі. Отже, використання стандартного методу ПЛР із наступним електрофоретичним розділенням аналізованих фрагментів в агарозних гелях є недоцільним для всіх вивчених маркерних систем. Своєрідне виключення із загальної картини становить P2/P8 і тільки за умови використання поліакриламідного гелю.

Неможливість сексування *Bubo bubo* за використання різних праймерних систем, внаслідок відсутності гетероморфних статевих хромосом, відмічена також й іншими авторами (Vucicevic et al, 2013; Valadan et al, 2017). Однак, слід зазначити, що в цих випадках автори використовували для розділення ампліфікованих фрагментів тільки агарозні гелі.

Акцент на використанні агарозних гелів пов'язаний, на нашу думку, із простотою використання й низькими витратами часу впродовж проведення рутинних лабораторних досліджень. При цьому, як вже було неодноразово згадано, тільки використання поліакриламідних гелів дає можливість ефективно проводити сексування *Bubo bubo* на основі ампліфікації із праймерами P2/P8. З огляду на певну трудоемність використання ПААГ, отримані результати все ж таки не можна назвати оптимальними з погляду простоти проведення аналізу, що призводить до необхідності подальшого пошуку ефективної системи сексування представників *Bubo bubo*. Проаналізуємо можливість використання рестрикційного аналізу, як інструменту типування особин за локусом *CHD*.

Наявність поліморфних сайтів рестрикції потенційно призводить до утворення рестрикційних фрагментів з вираженими відмінностями у довжині, що й дозволяє ефективно генотипувати особин за використання електрофоретичного розділення в агарозних гелях. Для проведення рестрикційного аналізу за основу

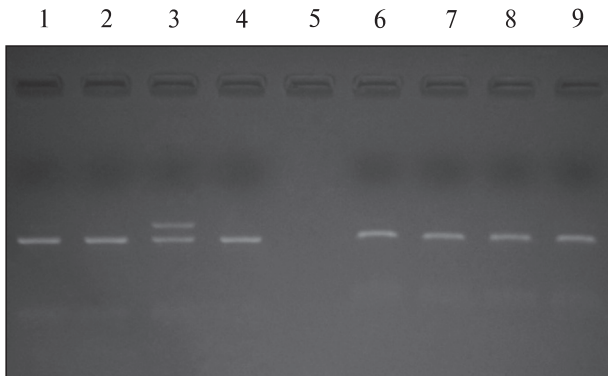


**Рис. 2.** Електрофореграма ампліфікованих фрагментів гену *CHD* за використання праймерів 2550F/2718R і P2/P8 в агарозному гелі. 1–11 – номери зразків; 6 – негативний контрольний зразок; 1–5 – 2550F/2718R; 7–11 – P2/P8

було обрано локус, фланкований праймерами P2/P8, який, згідно з літературними даними, має сайт рестрикції для *HaeIII* в консервативній ділянці *CHD<sup>z</sup>* хромосоми у деяких видів птахів. Аналіз нуклеотидних послідовностей гену *CHD<sup>z</sup>* (GenBank NCBI: KR019949.1) дав можливість виявити сайт рестрикції для *HaeIII*, що відзначений, також, і для *Gallus gallus*, використовуваної в якості еталонної послідовності (GenBank NCBI: AF006659.1). Водночас, у базі даних GenBank інформація про нуклеотидну послідовність гену *CHD<sup>w</sup>* для *Bubo bubo* відсутня, однак аналіз еталонної послідовності *Gallus gallus* (GenBank NCBI: AF006660.1) виявив відсутність сайту GGCC, що вказує на його поліморфні властивості й вимагає експериментального підтвердження для *Bubo bubo* шляхом проведення рестрикційного аналізу.

Отримані результати повністю підтверджують наші припущення. За результатами проведених досліджень виявлений поліморфізм гену *CHD* у дослідній групі птахів за сайтом рестрикції для *HaeIII* (*BsuRI*, сайт рестрикції GG<sup>^</sup>CC).

На рис. 3 наведено фото електрофореграми продуктів рестрикції фрагмента гену *CHD* представників виду *Bubo bubo*. Для розподілу рестрикційних фрагментів використовували агарозний гель (1,5%-ний). В якості альтернативного варіанту використовували ендонуклеазу *DdeI* (C<sup>^</sup>TNAG) (для якої є поліморфний сайт для *Gallus gallus*) та успішність за-



**Рис. 3.** Рестрикційний аналіз фрагменту гену *CHD*, ампліфікованого за використання праймерів P2/P8. 1–9 – номери зразків; 5 – негативний контрольний зразок; 1–4 – рестрикція *Hae*III; 6–8 – рестрикція *Dde*I

стосування якої була показана для деяких видів птахів у роботі Bermudez-Humarán L.G. зі співавторами (Bermudez-Humarán et al, 2002).

Як і передбачалося за результатом аналізу нуклеотидних послідовностей, фрагмент гену *CHD<sup>Z</sup>* містить сайт рестрикції для *Hae*III, що призводить до утворення двох фрагментів на електрофореграмі. Водночас, у випадку з *CHD<sup>W</sup>* утворення рестрикційних фрагментів не відбувається внаслідок відсутності сайту. Генотип *CHD<sup>ZZ</sup>* представлений на електрофореграмі у вигляді двох фрагментів ~ 302 й 65 п.н., генотип *CHD<sup>ZW</sup>* – у вигляді трьох ~ 367, 302 й 65 п.н. Найнижчий рестрикційний фрагмент *CHD<sup>Z</sup>* погано розрізняється на електрофореграмі, однак він присутній у кожному випадку. За результатами досліджень встановлено, що аналіз верхніх фрагментів цілком достатньо для типування особин, тому, у цьому випадку, візуалізація нижнього (найменшого) фрагменту не є обов'язковою.

За аналізом електрофореграми можна відзначити, що відмінності між рестрикційними фрагментами (для агарозних гелів) практично повністю компенсують різницю в довжині між ампліконами *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>*, яка спостерігається для інших видів птахів.

У свою чергу для *Dde*I не виявлено поліморфізму між фрагментами *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>*, що й призводить до наявності тільки одного варіанту розподілу рестрикційних фрагментів на електрофореграмі (рис. 3).

Ефективність використання методу PCR-RFLP на основі P2/P8 й *Hae*III для сексування птахів підтверджують дані, отримані Insee J. et al, 2014 для представників родини *Gruidae* (Журавлині), García CB et al, 2009 для представників родини *Accipitridae* (Яструбині), Ratino L et al, 2013 для представників родини *Procellariidae* (Буревісникові). Також на успішність використання *Hae*III для сексування безпосередньо *Bubo bubo* указує й Griffiths R. зі співавторами, однак на основі праймерів P2/P3 (Griffiths et al, 1996).

Використання методичних підходів, аналогічних вищезазначеним, на основі праймерних систем 2550F/2718R й 1237L/1272H не призводить до позитивних результатів – виявлено відсутність *Hae*III-поліморфізму ампліфікованих фрагментів *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>* в обох випадках, що унеможливує застосування даних маркерів для сексування представників *Bubo bubo*.

Ще одним альтернативним методом, який можна застосовувати у дослідженнях невираженого алейного диморфізму, є гетеродуплексний аналіз, який ми використовували на наступному етапі досліджень.

При плануванні досліджень ми виходили з припущення, що утворення гетеродуплексної ДНК відбувається як безпосередньо продовж циклів ПЛР, так й у результаті додаткової денатурації/ренатурації при змішуванні ампліфікованих фрагментів дослідних зразків з еталонними. Основне питання, що вимагає експериментальної оцінки, – чи достатньо виражені розбіжності в нуклеотидних послідовностях ампліконів *CHD<sup>Z</sup>* та *CHD<sup>W</sup>* для можливості візуалізації при електрофоретичному розподілі фрагментів? Іншими словами, виникла необхідність оцінити ступінь вираженості розходжень в значеннях електрофоретичної рухливості цільових фрагментів і гетеродуплексної ДНК експериментальним шляхом.

На рис. 4 представлено електрофореграму результатів гетеродуплексного аналізу продуктів ампліфікації фрагменту гену *CHD* (праймери P2/P8) у поліакриламідному гелі.

За результатами досліджень з'ясовано, що при змішуванні зразків, що містять амплікони *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>*, утворюються додаткові фрагменти гетеродуплексної ДНК (зразки 2, 4 й 6 на представленій електрофореграмі), наявність

яких дозволяє безпомилково визначити генотип птаці. При змішуванні зразків, що відносяться до однієї статі, картина гетеродуплексної ДНК зовсім інша – специфічні для першого варіанта фрагменти відсутні. Утворення гетеродуплексної ДНК у випадку змішування зразків з однаковими генотипами можна пояснити наявними розходженнями (потенційними SNP) у первинній структурі фрагментів *CHD*, а утворення специфічних фрагментів – вираженими відмінностями ампліконів *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>* (Indel-поліморфізм).

За результатами проведених досліджень успішність використання гетеродуплексного аналізу показана тільки для праймерів P2/P8. Аналіз маркерів 2550F/2718R та 1237L/1272H виявив їх недостатню ефективність для сексування *Bubo bubo*.

Використання описаного методичного підходу цілком успішно показало себе й у випадку з електрофоретичним розподілом продуктів ампліфікації в агарозних гелях (рис. 5).

Результати досліджень, отримані за використання агарозного гелю, повністю відповідають результатам у поліакриламідному гелі. При цьому слід зазначити, що при деяких розходженнях в інтенсивності свічення фрагментів, картина, що спостерігається, дуже схожа з результатами розподілу ампліконів при використанні класичної ПЛР на основі маркерів P2/P8 для інших видів птахів, наприклад папугових (*Psittacidae*).

Про утворення гетеродуплексів у процесі сексування птахів згадує також і Casey AE зі співавторами (Casey et al, 2009). Однак у даній роботі автори розглядають лише негативний аспект цього явища, що досить однобічно та з чим ми не можемо погодитися. Дійсно, у багатьох випадках утворення гетеродуплексної ДНК може призводити до невірної інтерпретації результатів досліджень. У цьому аспекті ми повністю згодні з авторами. Однак, і це дуже важливе зауваження, утворення гетеродуплексної ДНК суттєво залежить від концентрації ампліконів, що й призводить до варіативності інтенсивності фарбування аналізованих фрагментів. Аналіз електрофореграм у наведеному контексті дозволяє виявити розходження в інтенсивності свічення й зробити відповідні висновки. Більше того, викорис-

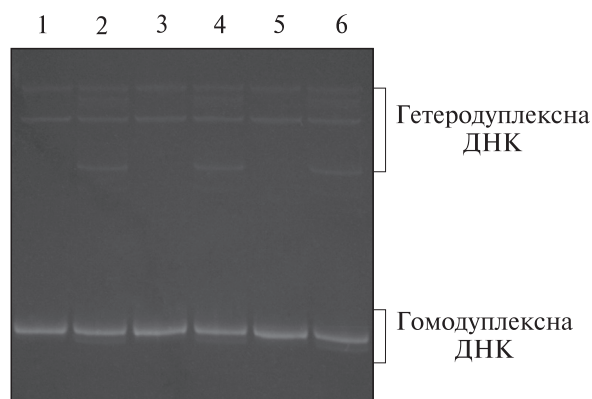


Рис. 4. Електрофореграма результатів гетеродуплексного аналізу продуктів ампліфікації фрагменту гену *CHD* (праймери P2/P8) у поліакриламідному гелі. 1–6 – номери зразків; 1, 3, 5 – генотип *CHD<sup>ZZ</sup>*; 2, 4, 6 – генотип *CHD<sup>ZW</sup>*

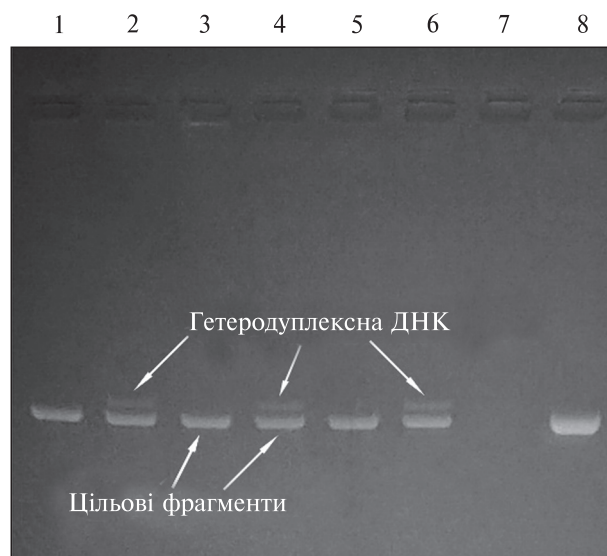


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту гену *CHD* (праймери P2/P8) і гетеродуплексної ДНК в агарозному гелі. 1–8 – номери зразків; 1, 3, 5, 8 – генотип *CHD<sup>ZZ</sup>*; 2, 4, 6 – генотип *CHD<sup>ZW</sup>*; 7 – негативний контрольний зразок

тання гетеродуплексного аналізу дає можливість максимально уникнути результатів, що ускладнюють інтерпретацію дії небажаних факторів, до яких відноситься потенційно різна ефективність ампліфікації фрагментів генів *CHD<sup>Z</sup>* й *CHD<sup>W</sup>* у випадку із самками птахів. Проведення додаткової процедури денатурації/ренатурації збільшує кількість гетеродуп-

лексної ДНК й, тим самим, підсилює ефективність сексування.

Гетеродуплексний аналіз, незважаючи на виявлену в дослідженнях ефективність для вирішення поставленого завдання, має цілу низку потенційно негативних характеристик, що істотно обмежує сферу його застосування. По-перше, ефективність утворення гетеродуплексної ДНК залежить від концентрації ампліконів, що, у свою чергу, визначається загальною ефективністю ПЛР і супутніми параметрами (концентрація і якість виділеної ДНК, параметри ампліфікаційної суміші тощо). Низька ефективність ПЛР може призводити до недостатнього для візуалізації утворення гетеродуплексів, у той час як наявність цільових фрагментів (гомодуплексної ДНК) буде зафіксовано з використанням стандартних підходів візуалізації продуктів ампліфікації в гелях (етидіум бромід). Саме тому, на наш погляд, візуалізація гетеродуплексної ДНК за використання фарбування сріблом у поліакриламідних гелях більш ефективна, ніж при фарбуванні інтеркалюючим барвником типу етидіуму броміду. Даний феномен пояснюється більшою чутливістю методу фарбування сріблом. Однак для агарозних гелів дана методика не підходить (як і використання поліакриламідних гелів у цілому внаслідок значної тривалості процедури), що додатково й визначає один з виражених недоліків гетеродуплексного аналізу для сексування птиці.

Іншим, не менш істотним недоліком гетеродуплексного аналізу, є стохастичний характер утворення самої гетеродуплексної ДНК. Утворення гетеродуплексів, що мають відмінності в параметрах електрофоретичної рухливості порівняно з гомодуплексними цільовими фрагментами, визначається сукупністю розходжень у первинній структурі ампліконів, що відноситься не тільки до типу нуклеотидних основ, але й до їхнього положення в молекулі. Чим більше розходжень між нуклеотидними послідовностями ампліконів, тим більше ймовірність розбіжності в значеннях електрофоретичної рухливості, внаслідок відмінностей у просторовій структурі макромолекул. Однак, ступінь виразності розходжень є похідною від ступеня поліморфності дослідного гену CHD, що може проявлятися в розбіжності положення

на електрофореграмі цільових фрагментів і гетеродуплексної ДНК при проведенні електрофорезу. У деяких випадках розходження в електрофоретичній рухливості фрагментів можуть бути мінімальними, що призводить до нездатності їхнього розділення, і, відповідно, до помилок типування з використанням агарозних гелів. Таким чином, беручи до уваги зазначене, гетеродуплексний аналіз можна розглядати лише у якості додаткового до основного інструменту сексування птиці.

**Висновки.** За результатами досліджень доведено наявність мономорфного для DdeI ( $CHD^Z+$ ;  $CHD^W+$ ) та поліморфного для HaeIII ( $CHD^Z+$ ;  $CHD^W-$ ) сайтів рестрикції у ампліфікованих за використання праймерів P2/P8 фрагментах  $CHD^Z$  та  $CHD^W$  *Bubo bubo*. Показано, що використання маркерної системи P2/P8 у рамках класичної ПЛР дає можливість ефективно проводити сексування птахів за умов електрофоретичного розподілу ампліфікованих фрагментів у поліакриламідному гелі. Доведено ефективність використання гетеродуплексного аналізу для диференціювання фрагментів  $CHD^Z$  й  $CHD^W$ . Визначено доцільність використання комплексного підходу (PCR-RFLP та аналіз гетеродуплексної ДНК) для вирішення завдань сексування представників виду *Bubo bubo* у практиці молекулярно-генетичних досліджень.

**Дотримання етичних стандартів.** Дослідження проведені за використання в якості джерела біологічного матеріалу пір'їн особин *Bubo bubo* за відсутності безпосередніх маніпуляцій з птахами.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Наукові дослідження не фінансувалися з боку сторонніх комерційних організацій.

ANALYSIS OF CHD GENE POLYMORPHISM AS A MODEL OBJECT FOR MOLECULAR SEXING OF EURASIAN OWL (*BUBO BUBO*)

R. O. Kulibaba, Yu. V. Liashenko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine

The Institute of Animal Breeding, the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 1-A,

Tvarynnykiv Str., Kharkiv, 61026, Ukraine  
E-mail: romankx37@gmail.com

The studies of CHD gene polymorphism as a model object for molecular sex determination of *Bubo bubo* (Eurasian eagle-owl) were carried out. The methods of PCR for amplification of the target regions of CHD gene, using P2/P8, 2550F/2718R, and 123L/1272H markers systems, restriction (PCR-RFLP) and heteroduplex methodological approaches were analyzed. It was shown that the use of P2/P8 markers system within PCR is efficient for avian sexing only under electrophoretic separation of the fragments in polyacrylamide gel. The application of 2550F/2718R and 123L/127H markers demonstrated their insufficient efficiency both in agarose and polyacrylamide gels, because of the impossibility to differentiate between genotypes *CHD<sup>zz</sup>* and *CHD<sup>zw</sup>*. The presence of a polymorphic restriction site for HaeIII in *CHD<sup>z</sup>* and *CHD<sup>w</sup>* fragments, amplified with primers P2/P8, has been proven. No polymorphic site has been detected for DdeI restriction endonuclease. High efficiency of heteroduplex analysis, based on P2/P8 markers system, for sexing individuals under electrophoretic distribution of the amplified fragments both in agarose and polyacrylamide gels was proven. In case of experimental samples, containing *CHD<sup>z</sup>* and *CHD<sup>w</sup>* amplicons, the additional fragments of heteroduplex DNA were formed. The presence of the latter allowed determining the genotype of an individual accurately.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Barros TB, Fraga RE, Ramos CN, Tomazi L. (2017) Improvement of the Molecular Sexing of Parrots in the State of Bahia. *Acta Biologica Paranaense* 46(3–4):89–107. doi: 10.5380/abpr.v46i0.56731

Bermudez-Humaran LG, Chavez-Zamarripa P, Guzman-Velasco A, Leal-Garza CH, Montes de Oca-Luna R. (2002) Loss of Restriction Site DdeI, used for Avian Molecular Sexing, in *Oreophaps derbianus*. *Reprod Domest Anim* 37:321–323. doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00362.x

Bermudez-Humaran LG, Garcia-Garcia A, Leal-Garza CH, Riojas-Valdes VM, Jaramillo-Rangel G, Montes-de-Oca-Luna R. (2002) Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds. *J Exper Zool* 292(7):77–80. doi: 10.1002/jez.10070

Cakmak E, Peksen CA, Bilgin CC. (2017) Comparison of three different primer sets for sexing birds. *Journal of Veterinary Diagnos Invest* 29(1):59–63. doi: 10.1177/10406387166675197

Casey AE, Jones KL, Sandercock BK, Wisely SM. (2009) Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing.

*Mol Ecol Res* 9:61–65. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02307.x

Corters O, Barroso A, Dunner S. (1999) Avian sexing: an optimized protocol using polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism. *J Veterin Diagnost Invest* 11:297–299. doi: 10.1177/104063879901100318

Delgado MD, Penteriani V. (2004) Gender determination of Eurasian Eagle-Owls (*Bubo bubo*) by morphology. *J Raptor Res* 38:375–377

Ellegren H (1996) First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc Biol Sci* 263(1377):1635–1641. doi: 10.1098/rspb.1996.0239

Fridolfsson A, Ellegren H. (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Boil* 30:116–121. doi: 10.2307/3677252

Garcia CB, Insausti JA, Gil JA, Frutos A, Alcantara M, Gonzalez J, Cortes MR, Bonafonte JI, Arruga MV. (2009) Comparison of different procedures of DNA analysis for sex identification in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). *Europ J Wild Res* 55:309–312. doi: 10.1007/s10344-008-0239-y

Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc Royal Soc London B* 263:1251–1256. doi: 10.1098/rspb.1996.0184

Griffiths R, Double M, Orr K, Dawson R. (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7:1071–1075. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x

Griffiths R, Tiwari B. (1995) Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375:454. doi: 10.1038/375454a0

Insee J, Kamolnorrath S, Baicharoen S, Chumpadang S, Sawasu W, Wajjwalku W. (2014) PCR-based Method for Sex Identification of Eastern Sarus Crane (*Grus antigone sharpii*): Implications for Reintroduction Programs in Thailand. *Zool Sci* 31:95–100. doi: 10.2108/zsj.31.9

Kahn NW, John JST, Quinn TW. (1998) Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *The Auk* 115(4):1074–1078. doi: 10.2307/4089527

Krüger O. (2005) The Evolution of Reversed Sexual Size Dimorphism in Hawks, Falcons and Owls: A Comparative Study. *Evol Ecol* 19(5):467–486. doi: 10.1007/s10682-005-0293-9

Lee MY, Hong YJ, Park SK, Kim YJ, Choi TY, Lee H, Min MS. (2008) Application of Two Complementary Molecular Sexing Methods for East Asian Bird Species. *Genes Genom* 30(4):365–372

Mario Leyn-Ortega M, del Mar Delgado M, Martínez JE, Penteriani V, Calvo JF. (2016) Factors affecting survival in Mediterranean populations of the



- Eurasian eagle owl. *Eur J Wild Res* 62:643–651. doi: 10.1007/s10344-016-1036-7
- Mataragka A, Balaskas C, Sotirakoglou K, Ikonomopoulos J. (2020) Comparative evaluation of the performance of the PCR assays commonly used for the determination of sex in avian species. *J. King Saud University – Sci* 32:228–234. doi: 10.1016/j.jksus.2018.04.020
- Medeiros RT, Chaves FG, Vecchi MB, Nogueira DM, Alves MAS. (2019) Molecular sexing and intersexual differences in the morphometry of the Hangnest Tody-Tyrant *Hemitriccus nidipendulus* (*Passeriformes: Rhyncocyclidae*). *Zoologia* doi: 10.3897/zoologia.36.e32771
- Miyaki CY. (1998) Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol* 17:415–423. doi: 10.1002/(SICI)1098-2361(1998)17:5<415::AID-ZOO6>3.0.CO;2-2
- Patino L, Cruz M, Martinez P, Cedeno-Escobar V. (2013) Using PCR-RFLP for sexing of the endangered Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Genet Mol Res* 12(2):4760–4767. doi: 10.4238/2013.October.18.13
- Penteriani V, Alonso-Alvarez C, del Mar Delgado M, Sergio F, Ferrer M. (2006) Brightness variability in the white badge of the eagle owl *Bubo bubo*. *J. Avian Biol* 37(1):110–116. doi: 10.1111/j.0908-8857.2006.03569.x
- Ravindran S, Saufi S, Amni WN, Ishak I, Hamid NH, Abidin CMRZ, Ahmad AH, Azzam G, Salim H. (2018) Sex identification comparison of barn owls (*Tyto alba javanica*) using morphological features and molecular-based methods. *Slovak Raptor J.* 12:47–54. doi: 10.2478/srj-2018-0005
- Ravindran S, Woo WK, Saufi S, Amni WN, Hamid NH, Abidin CMRZ, Ishak I, Azzam G, Salim H. (2019) Molecular Sexing of Southeast Asian Barn Owl, *Tyto alba javanica*, using Blood and Feather. *Trop. Life Sci Res* 30(2):13–23. doi: 10.21315/tlsr2019.30.2.2
- Sacchi P, Soglia D, Maione S, Meneguz G, Campora M, Rasero R. (2004) A non-invasive test for sex identification in short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Prob* 18(3):193–196. doi: 10.1016/j.mcp.2004.01.002
- Seidensticker MT, Holt DW, Detienne J, Talbot S, Gray K. (2011) Sexing young snowy owls. *J Raptor Res* 45(4):281–289. doi: 10.3356/JRR-11-02.1
- Tornberg R, Mikkola H, Rytönen S. (2016) Morphometric sex determination of Great Grey Owls *Strix nebulosa*. *Ornis Norvegica* 39:6–10. doi: 10.15845/on.v39i0.991
- Valadan R, Nejatollahi F, Ehsani-nori H, Habibi H, Amini H, Aliabadian M. (2017) Avian gametologs as molecular tags for sex identification in birds of prey of Iran. *Zoo Biol* 36(8):289–293. doi: 10.1002/zoo.21363
- Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z. (2013) Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. *Zoo Biol* 32:269–276. doi: 10.1002/zoo.21010
- Wang LC, Severinghaus LL, Chen CT, Liu LY, Pan CH, Huang D, Lee HY, Lir JT, Chin SC, Pu CE. (2008) Sex Identification of Owls (Family Strigidae) Using Oligonucleotide Microarrays. *J Heredity* 99(2):187–192. doi.org/10.1093/jhered/esm107
- Wang PH, Hsu HA, Chao MC, Chan FT, Wang LM, Lin PI, Tsao HS, Yuan HW, Chen CC, Ding ST. (2013) Sex identification in the Collared Scops Owl (*Otus bakkamoena*) with novel markers generated by random amplified polymorphic DNA. *Conserv Genet Res* 5:239–242. doi: 10.1007/s12686-012-9778-3

Надійшла в редакцію 13.10.20  
Після доопрацювання 03.02.21  
Прийнята до друку 18.07.21