

ПОШУК СТАТЕВОСПЕЦИФІЧНИХ ДНК-МАРКЕРІВ У ЛОСОСЕВИХ ВИДІВ РИБ

Бурхливий розвиток молекулярної біології наприкінці ХХ ст., зокрема геноміки та протеоміки, сприяв створенню нових методів досліджень в аквакультурі, спрямованих на прискорене отримання рибної продукції та удосконалення способів культивування об'єктів світового рибництва. Новітні технології успішно використовують у вивченні питань ембріонального розвитку риб, проблем статевої диференціації, впливу гормонів росту та стійкості до інфекційних хвороб [1].

Культивування одностатевих або стерильних популяцій риб за умов сучасної аквакультури є економічно доцільним з багатьох причин. По-перше, у деяких видів риб самці або самиці ростуть швидше. По-друге, деякі види риб стають статевозрілими у ранньому віці, не досягнувши оптимальних розмірів для ринкової реалізації. По-третє, статева диференціація може впливати на якість м'яса та розміри, оскільки за настання статевої зрілості темпи росту риби різко знижуються. Також деякі дослідження показали, що статевий диморфізм впливає й на інші важливі економічні чинники у рибництві, такі як резистентність до хвороб і толерантність до води поганої якості [2, 3]. Тому у рибоводів є великий інтерес до можливості продукування покоління тільки самиць або тільки самців.

Існує декілька методів одержання одностатевих або стерильних популяцій риб в аквакультурі, наприклад статевий відбір, стерилізація, гібридизація, гіногенез, андрогенез та поліплоїдія. Одностатеві популяції риб можна виділити методом гормональної реверсії статі. При цьому фенотипова стать може бути змінена під впливом статевих гормонів естрогенів або андрогенів у певний період статевої диференціації. Особливості онтогенезу в риб роблять їх сприятливими до статевих маніпуляцій. І хоча чоловічий чи жіночий генотип у риб визначається під час запліднення, стать за фенотипом формується пізніше, у процесі розвитку. Гормональна реверсія статі –

це маніпуляція контролю репродукції у риби та підвищення темпів її росту [4].

Метод непрямой фемінізації, що акредитований у країнах Європейського Союзу, перед одержанням 100%-го покоління самиць передбачає етап відбору так званих «неосамців». Це фенотипові самці, які мають генотип самиці (XX), у яких під дією андрогенів (17-б метилтестостерону) розвинулися сім'яники. У таких фенотипових самців формуються зрілі сперматозоїди, здатні запліднювати ікру. Однак при цьому генотип особин зберігається, а тому всі статеві клітини інвертованих самців міститимуть тільки X-статеві хромосоми. У разі запліднення звичайних, не оброблених гормоном самиць інвертованими самцями у першому поколінні (F1) будуть одностатеві популяції самиць. Ключовим етапом за відбору неосамців із покоління F0 є ідентифікація генотипових самців (XY), які не братимуть участі у наступному схрещуванні з метою виділення 100%-го покоління самиць.

Райдужна форель *Oncorhynchus mykiss*, струмкова форель *Salmo trutta*, дунайський лосось *Hucho hucho* та харіус європейський *Thymallus thymallus* – представники лососевих, найцінніші риби річок басейну Дунаю, що витікають із Карпат. Це традиційні об'єкти лососівництва в Україні, які вирощують для потреб ікрано-товарного виробництва. Штучне розведення цих видів риб із застосуванням сучасних біотехнологій сприятиме збільшенню їх чисельності. Одним із біотехнологічних напрямів в аквакультурі є реверсія статі, а пошук статевоспецифічних ДНК-маркерів, які необхідні для експрес-діагностики статі у риб, є його неодмінним етапом. Тому метою роботи було проаналізувати нуклеотидні послідовності Y-хромосом лососевих видів риб і обрати фрагменти для відбору специфічних олігонуклеотидних праймерів та на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) розробити

ти метод експрес-діагностики статі у лососевих, що їх вирощують в Україні.

Матеріали та методи

Для виділення ДНК застосовували фенольно-хлороформний метод. ДНК виділяли з плавників самиць та самців райдужної форелі ($\sigma n = 4$, $\text{♀} n = 4$), струмкової форелі ($\sigma n = 3$, $\text{♀} n = 3$), дунайського лосося ($\sigma n = 4$, $\text{♀} n = 4$) та харіуса європейського ($\sigma n = 4$, $\text{♀} n = 4$). Плавники відбирали прижиттєво. Із тканини плавників робили гомогенат, використовуючи гомогенізатор ІКА T18 Ultra Turrex (Німеччина). Потім додавали буфер для лізису (10 мМ Tris-HCl, pH=8,0, 0,1 М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5% додецилсульфату натрію) та протеїназу К. Інкубація тривала 2 год за 37 °С. ДНК екстрагували по чергово фенолом та хлороформом, центрифугуючи упродовж 5 хв за 13 000 об/хв на мікроцентрифузі Ependorf (Німеччина). До супернатанта додавали 0,1 об'єму 3 М натрій ацетату (pH 5,2) та 2,5 об'єму абсолютного етанолу. Преципітація ДНК відбувалася за кімнатної температури упродовж 1 год. Осаджували ДНК за 13 000 об/хв протягом 10 хв, осад промивали 70%-м етанолом. ДНК розчиняли у деіонізованій воді, вільній від нуклеаз [5]. Концентрацію та якість очищеної ДНК вимірювали на спектрофотометрі APEL PD-303 UV (Японія).

Олігонуклеотидні праймери. Аналіз послідовностей ДНК-фрагментів Y-хромосом деяких видів лососевих, узятих з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI), проводили за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) та програмного забезпечення MEGA 6.0. Для розроблення олігонуклеотидних праймерів, визначення їх специфічності та фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 11.

ПЛР. Ампліфікацію проводили на термоциклері 96 Universal Gradient PEQ STAR (PEQLAB, Німеччина). До складу реакційної суміші входили такі компоненти: 12,5 мкл DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 1 мкл ДНК та стерильна деіонізована вода (до загального об'єму 25 мкл). Ампліфікація складалась із циклу попередньої денатурації за 94 °С (3 хв) та 30 циклів денатурації за 94 °С (30 с), відпалу праймерів за 60 °С (30 с) і синтезу за 72 °С (1 хв). Наприкінці ампліфікації проводили додатково цикл синтезу за 72 °С упродовж 7 хв. Після ПЛР продукти аналізували у 2%-му агарозному гелі в ТАЕ-бу-

фері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Визначення нуклеотидної послідовності.

Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно до протоколу виробника. Нуклеотидні послідовності ДНК досліджували на автоматичному ДНК-секвенаторі Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, США) з використанням набору для секвенування BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ДНК дунайського лосося, харіуса європейського, райдужної та струмкової форелей проводили за допомогою алгоритмів ClustalW у програмному забезпеченні MEGA версії 6.0 та BLASTN. Послідовності інших лососевих риб було одержано з бази даних NCBI.

Результати та обговорення

Результати аналізу послідовностей фрагментів ДНК лососевих видів риб показали, що високий ступінь гомології Y-хромосоми характерний тільки для риб, що належать до одного роду. Так, наприклад, у представників родів *Salmo*, *Oncorhynchus* і *Salvelinus* відсутня повна гомологія в послідовностях Y-хромосоми, але є короткі висококонсервативні ділянки, які характерні для багатьох видів риб із родини лососевих [6]. Аналізуючи послідовності ДНК представників роду *Oncorhynchus* – чавичі *O. tshawytscha*, кижуча *O. kisutch* та райдужної форелі *O. mykiss*, виявили такі локуси з гомологією понад 90%. Розміри гомологічних фрагментів становили від 2000 до 4000 пар нуклеотидів (п.н.) [7, 8]. Ці фрагменти були характерні тільки для самців і відсутні в послідовностях ДНК самиць. Окрім представників роду *Oncorhynchus*, подібні послідовності виявлено в атлантичного лосося *Salmo salar*, струмкової форелі *S. trutta*, гольця *Salvelinus fontinalis* та інших представників родини лососевих [9]. Ці локуси було названо статеводиморфічними (статевоспецифічними) – від англ. *sexually dimorphic on Y chromosome* (sdY).

Аналіз усіх доступних ДНК послідовностей локусів sdY у Банку геномів NCBI за допомогою алгоритму Neighbor-joining у програмі MEGA версії 6.0 показав, що цей висококонсервативний

локус присутній практично у всіх лососевих, за винятком сигових (рід *Coregonus*).

Як показали результати досліджень, специфічні олігонуклеотидні праймери до локусу *sdY* успішно ампліфікували очікувані за розміром фрагменти ДНК самців райдужної форелі, струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського. Довжина ПЛР продуктів була в діапазоні від 500 до 800 п.н. залежно від олігонуклеотидних праймерів (табл.).

Підібрані олігонуклеотидні праймери було апробовано в реакції з ДНК самців і самиць райдужної форелі, струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського. Результати експерименту показали, що продукти ПЛР для райдужної форелі присутні тільки в зразках ДНК самців, а розмір їх становив 880 п.н. (табл.). Розміри специфічних ампліконів для самців струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського – 607, 558 та 521 п.н. відповідно (табл.).

Специфічність ампліфікації перевіряли за допомогою нуклеотидного аналізу продуктів ПЛР. Результати секвенсу показали, що ампліфіковані фрагменти відповідали ділянкам статевоспецифічних локусів Y-хромосоми лососевих видів риб. Слід зазначити, що олігонуклеотидні праймери, використовувані для ампліфікації статевоспецифічного локусу *sdY* у струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського, є взаємозамінними. Комбінація праймерів призводить до утворення продуктів різної довжини у діапазоні від 200 до 900 п.н. Водночас за деяких варіантів ПЛР-продукти з'являлись і в самиць. Тому в таблиці зазначено пари олігонуклеотидних праймерів для діагностики лише самців. Така складова Y-хромосоми цих видів риб свідчить про високу консервативність статевоспецифічного локусу *sdY* та його присутність у різних представників родини лососевих.

Таким чином, у результаті точного підбору олігонуклеотидних праймерів було розроблено метод на основі ПЛР для експрес-ідентифікації самців райдужної форелі, струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського. На етапі відбору самців-реверсантів у процесі гормональної реверсії статі цей метод дасть змогу ідентифікувати генотипових самців (XY) у дослідній групі, яких не слід використовувати у наступному спаровуванні з метою виділення 100%-го покоління самиць. Враховуючи той факт, що для продукування червоної ікри культивування самців не потрібне, а ідентифікація статі у лососевих стає можливою лише після декількох років, питання діагностики статі у лососевих риб є вкрай актуальним. Наприклад, можливість експрес-ідентифікації самців дунайського лосося та їх відбракування знижує вартість культивування самиць до 30%.

Часто X- і Y-хромосоми у деяких видів риб, таких як медака *Oryzias latipes*, мають аналогічну морфологію і несуть однакову генетичну інформацію [10]. Ittura et al. (2001) за допомогою флюоресцентної гібридизації *in situ* показали, що ДНК-маркер 5S rDNA райдужної форелі гібридує у самиць у XX-хромосомі за двома локусами, а в самців – за двома локусами в XY-хромосомі [11]. Це свідчить про схожість X- і Y-хромосом, і на відміну від птахів і ссавців рання стадія диференціації Y-хромосоми у риб робить їх важливими об'єктами дослідження еволюції статевих хромосом.

У 10% видів риб, у тому числі й лососевих, ідентифіковано статеві маркери [12]. За допомогою звичайної ПЛР можна ідентифікувати ці специфічні послідовності ДНК і тим самим швидко визначити стать особини. Однак не у всіх цінних видів риб ідентифіковано статеві ДНК-маркери. Зокрема, результати експериментів лабораторій Німеччини, Франції та Італії, які було сфо-

Таблиця

Олігонуклеотидні праймери до статевоспецифічних локусів Y-хромосом райдужної форелі, струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського

Вид	Олігонуклеотидні праймери	T _a , °C	Продукт, п.н.
Райдужна форель <i>Oncorhynchus mykiss</i>	5'-GTTTCATATGCCAGGCTCAAC-3' 5'-CGATTAGAAAGGCCTGCTTG-3'	58	880
Струмкова форель <i>Salmo trutta</i>	5'-GTGGAGTACTGCGAAGATGAG-3' 5'-CTTAAACCCTCCACCCTCC-3'	63	607
Харіус європейський <i>Thymallus thymallus</i>	5'-ATGGCTGACAGAGAGGCCAGA-3' 5'-CTTAAACCCTCCACCCTCC-3'	65	521
Дунайський лосось <i>Hucho hucho</i>	5'-ATGGCTGACAGAGAGGCCAGA-3' 5'-GCATAGATGCCTCCCTAGA-3'	67	880

кусовано на вивченні питання ідентифікації статі у чотирьох різновидів осетрів (*Acipenser baerii*, *A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*), свідчать про відсутність статевих ДНК-маркерів, а отже й неможливість експрес-діагностики статі методом ПЛР [13].

Статевий диморфізм притаманний більшості культивованих видів риб. Так, наприклад, самці каналного сома *Ictalurus punctatus* та тилляпії ростуть швидше за самиць, тоді як самиці білого амура *Stenopharyngodon idella*, райдужної форелі *O. mykiss*, інших лососевих і корошових – швидше за самців [14]. Самиці лососевих мають перевагу в культивуванні над самцями, оскільки характеризуються пізнім статевим дозріванням, швидкими темпами росту та поліпшеними смаковими показниками м'яса. Ручне відокремлення статі може забезпечити культивування одностатевих популяцій, але цей процес є високозатратним, тривалим, малоефективним і має високий

відсоток похибки. Молодь риби слід вирощувати до розміру, який дасть можливість розпізнати стать, а з другого боку, близько половини популяції стане непотрібною. Непотрібну стать необхідно відокремити якнайшвидше для запобігання неконтрольованій репродукції. Тому методи на основі ДНК-технологій, які здатні ідентифікувати стать на ранніх етапах онтогенезу, мають значні переваги над механічним сортуванням риби.

Висновок

За допомогою звичайної ПЛР нами розроблено метод ідентифікації статі у райдужної форелі, струмкової форелі, дунайського лосося та харіуса європейського. Метод дає змогу діагностувати стать у вищезазначених видів риб на ранньому етапі процесу реверсії статі та відбракувати генотипових самців з метою зменшення затрат на їх утримання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dunham R. A. Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. – CABI Publishing Wallingford. – 2004. – 372 p.
2. Brunelli J.P., Wertzler K.J., Sundin K., Thorgaard G.H. Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon // *Genome*. – 2008. – 51, № 9. – P. 739–748.
3. Haffray P., Lebegue E., Jeu S., Guennoc M., Guiguen Y., Baroiller J.F., Fostier A. Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation: An investigation using steroid sex-inverted males and females // *Aquaculture*. – 2009. – 294. – P. 30–36.
4. Sacobie C.F.D., Benfey T.J. Sex differentiation and early gonadal development in brook trout // *North Amer. J. Aquacult.* – 2005. – 67. – P. 181–186.
5. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual [3rd edition]. – New York Cold Spring Harbour, 2001.
6. Phillips R.B., Konkol N.R., Reed K.M., Stein J.D. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae) // *Genetica*. – 2001. – 111. – P. 119–123.
7. Felip A., Young W.P., Wheelera P.A., Thorgaarda G.H. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquaculture*. – 2005. – 247. – P. 35–43.
8. Rud Yu.P., Maistrenko M.I., Buchatsky L.P. Sex identification of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by polymerase chain reaction // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2015. – 46, № 2. – P. 65–70.
9. Yano A., Nicol B., Jouanno E., Quillet E., Fostier A., Guyomard R., Guiguen Y. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids // *Evol. Appl.* – 2013. – 6. – P. 486–496.
10. Nakamura M., Kobayashi Y., Miura S., Alam M.A., Bhandari R.K. Sex change in coral reef fish // *Fish Physiol. Biochem.* – 2005. – 31, № 2–3. – P. 117–122.
11. Iturra P., Lam N., Fuente M., Vergara N., Medrano J.F. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH) // *Genetica*. – 2001. – 111. – P. 125–131.
12. Devlin R.H., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences // *Aquaculture*. – 2002. – 208. – P. 191–364.
13. Wuertz S., Gaillard S., Barbisan F., Carle S., Congiu L., Forlani A., Aubert J., Kirschbaum F., Tosi E., Zane L., Grillasca J.-P. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker // *Aquaculture*. – 2006. – 258. – P. 685–688.
14. Matsuda M., Nagahama Y., Shinomlya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Horik H., Hamaguchi S., Sakaizumi M. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish // *Nature*. – 2002. – 417. – P. 559–563.

RUD YU.P.¹, ZALOILO O.V.¹, BUCHATSKIY L.P.^{1,2}

¹ *Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 03164, Kyiv, Obukhivska str., 135, e-mail: rud_yuriy@ifr.com.ua*

² *Taras Shevchenko National University of Kyiv, SSC Institute of Biology, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrs'ka str., 64/13, e-mail: irido1@bigmir.net*

DETERMINATION OF SEX-LINKED DNA LOCI IN SALMONIDS

Aim. To analyze the nucleotide sequences of sex-specific DNA-markers of salmonid fishes and to develop the polymerase chain reaction for rapid diagnostic of sex in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, brook trout *Salmo trutta*, huchen *Hucho hucho* and grayling *Thymallus thymallus*. **Methods.** The methods of DNA extraction, oligonucleotide primer selection involving NCBI, BLAST, MEGA 6.0 and Vector NTI 11 software, conventional PCR assay, Sanger sequencing, ClustalW algorithm for sequence analyzing were used. **Results.** The PCR-products were in size of 880, 607, 521 and 558 for rainbow trout, brook trout, grayling and huchen respectively. The specificity of amplification was determined by nucleotide sequence analysis of PCR-products. All amplified fragments were referred to sex-specific locuses of Y chromosomes in males of investigated fish species. **Conclusions.** The sex determination in above mentioned fish species and identification of genotypic males under process of hormonal sex reversion can be provided using conventional PCR. Present method relates to rapid diagnostics because the data analysis and return of results back to fish farm take one single day.

Keywords: DNA-markers, PCR diagnostics, sex reversion, salmon raising.