

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет тваринництва та водних біоресурсів

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри біології тварин

(назва кафедри)

Кулібаба Р.О.

(підпис)

(ПІБ)

“ ___ ” _____ 2025р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **Молекулярне сексування різних видів риб**

Спеціальність: **207 «Водні біоресурси та аквакультура»**

(код і назва)

Гарант освітньої програми

_____ к.с.-г.н., доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

_____ Хижняк М.І.

(ПІБ)

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

_____ д.с.-г.н., професор

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

_____ Кулібаба Р.О.

(ПІБ)

(підпис)

(ПІБ студента)

Київ – 2025

_____ Добрівська В.О.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет тваринництва та водних біоресурсів

Завідувач кафедри біології тварин

назва кафедри)

Кулібаба Р.О.

(підпис)

(ПІБ)

“ _____ ” _____ 2025р.

ЗАВДАННЯ

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентці

Добрівській Валерії Олександрівні (фамілія, ім'я, по батькові)

Спеціальність: Н5 «Водні біоресурси та аквакультура»
(код і назва)

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: Молекулярне сексування різних видів риб

України від «31» жовтня 2025 р. № 1973 «С»

Термін подання завершеної роботи (проєкту) на кафедру «19» травня 2025 р.
(рік, місяць, число)

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: наукові публікації за темою роботи, інформація з сайтів виробників спеціалізованого обладнання для молекулярної біології, міжнародні бази даних NCBI та ENSEMBL genome browser, on-line інструментарій спеціалізованих баз даних секвенованих послідовностей (Nucleotide BLAST, Pick Primers, Primers-BLAST).

Перелік питань, які потрібно розробити: проаналізувати наявну в науковій літературі інформацію щодо особливостей прояву статевого диморфізму у риб; провести порівняльний аналіз щодо застосування різних методичних підходів та маркерних систем для визначення статі риб з невираженим статевим диморфізмом; визначити найбільш ефективні маркерні системи, на основі методу ПЛР та електрофоретичної детекції продуктів ампліфікації/рестрикції, для визначення статі риб; провести пошук високоспецифічних маркерів статі риб за використання міжнародних баз даних NCBI та Ensembl; проаналізувати ефективність типування статі за різних маркерних систем за використання

спеціалізованого on-line інструментарію (Nucleotide BLAST, Pick Primers,

Перелік графічних документів: рисунки, таблиці

Дата видачі завдання “10” листопада 2025 р.

Керівник бакалаврської

(підпис)

(прізвище та ініціали)

підпис)

(прізвище та ініціали студента)

Кулібаба Р.О.

Добрівська В.О.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна бакалаврська робота на тему «*Молекулярне сексування різних видів риб*» включає вступ, три розділи основної частини, висновки та список використаних джерел.

Робота містить 1 рисунок, 3 таблиці. Список використаної літератури налічує 44 джерела, серед яких представлені сучасні українські та іноземні публікації. Обсяг дипломної роботи – 65 сторінки.

Актуальність теми обумовлена зростаючими потребами аквакультури в точному та ранньому визначенні статі риб для формування одностатевих популяцій, що сприяє підвищенню продуктивності, рентабельності та керованості селекційних програм. Враховуючи складність систем статевого визначення у риб (ХУ-, полігенні та середовищезалежні), сучасні молекулярно-генетичні підходи стають незамінними для ефективного сексування в рибництві та декоративній аквакультурі.

Мета роботи – комплексний аналіз сучасних молекулярно-генетичних методів, які застосовуються для визначення статі риб, з акцентом на їхню ефективність, специфічність та практичне значення для декоративної аквакультури та рибництва.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичні підходи до ідентифікації статі у риб з невираженим статевим диморфізмом.

Предмет дослідження – методи молекулярного сексування. Зокрема на основі різних типів ДНК-маркерів.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати сучасний стан досліджень у галузі визначення статі у риб.
2. Охарактеризувати технологічні аспекти використання SSR та SNP-маркерів у молекулярному сексуванні.
3. Проаналізувати методи статистичної обробки результатів генотипування.
4. Визначити переваги та обмеження молекулярних підходів до визначення статі.
5. Оцінити практичні перспективи впровадження технологій сексування в декоративній аквакультурі та рибництві України.

Методи дослідження – аналіз літературних джерел, систематизація експериментальних результатів попередніх досліджень, біоінформатичні підходи, статистичні методи.

Інформаційною базою дослідження є наукові публікації з баз даних Scopus, Web of Science, Frontiers, а також матеріали сучасних досліджень провідних генетичних лабораторій у сфері рибництва.

Зміст одержаних результатів: у роботі узагальнено переваги та обмеження застосування SSR і SNP для визначення статі у риб з невираженим статевим диморфізмом, наведено приклади їх успішного впровадження (тіляпія, осетрові, медака, лосось), описано методи ідентифікації статевоспецифічних маркерів. Висвітлено перспективні напрями розвитку галузі, включно з використанням молекулярно-генетичних методів досліджень.

Практичне значення результатів полягає у можливості застосування молекулярних технологій у спеціалізованих лабораторіях України для підвищення продуктивності, точності селекції та зниження витрат на вирощування особин невизначеної статі. Запропоновані підходи також можуть бути використані у програмах збереження біорізноманіття та популяційного моніторингу.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

п.н. – пар нуклеотидів;

ACRS-PCR – (artificially created restriction site-PCR) – штучно створений сайт рестрикції ПЛР;

– (allele-specific polymerase chain reaction) – алель-специфічна полімеразна ланцюгова реакція;

– статевий розмірний диморфізм;

Temperature-Dependent Sex Determination) – температурно-залежне визначення статі;

GSD (Genotypic Sex Determination) – генетично детерміноване визначення статі;

PCR – полімеразна ланцюгова реакція;

SNP – однуклеотидний поліморфізм;

MAS – маркер-асоційована селекція;

QTL – локуси кількісних ознак;

RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів.

ВСТУП

Актуальність теми. У сучасних умовах глобальних кліматичних змін, деградації природних водних екосистем та зростання попиту на білкову продукцію, аквакультура перетворюється на стратегічну галузь забезпечення продовольчої безпеки. Успішність технологій в аквакультурі значною мірою залежить від біологічних особливостей вирощуваних об'єктів, серед яких ключовим є статевий диморфізм [12]. У багатьох видів риб – наприклад, тилапії, сома, осетрових і лососевих – самці або самиці мають суттєві переваги щодо темпів росту або товарних характеристик. Саме тому молекулярне сексування риб, тобто визначення статі особин на ранніх стадіях онтогенезу, набуває все більшого значення в рибницькій практиці.

Особливу актуальність ця тема має в контексті переходу до інтенсивних біотехнологічних систем вирощування, де контроль за співвідношенням статей дозволяє уникнути небажаного розмноження, оптимізувати щільність посадки, підвищити продуктивність і рентабельність виробництва. Крім того, для рідкісних або зникаючих видів, визначення статі є критично важливим для формування репродуктивних пар та збереження генофонду [32]. Розвиток молекулярно-генетичних технологій, зокрема застосування SSR- і SNP-маркерів, відкрив нові можливості для високоточного, раннього та неінвазивного сексування, що стало потужним інструментом у селекції, генетичному моніторингу та охороні біорізноманіття.

Мета і завдання дослідження. У світлі вищезазначеного, *метою* даної кваліфікаційної роботи є наукове обґрунтування і аналіз ефективності

молекулярно-генетичних методів визначення статі у риб, а також вивчення перспектив їх практичного застосування в рибництві та декоративній аквакультурі України.

Для досягнення цієї мети передбачено вирішення таких *завдань*:

- дослідити теоретичні засади процесів статевої диференціації у риб;
- охарактеризувати генетичні механізми визначення статі;
- проаналізувати можливості застосування різних типів ДНК-маркерів для ідентифікації статі;
- розглянути сучасні методи біоінформатики та статистичної обробки генотипових даних;
- узагальнити приклади успішного впровадження молекулярного сексування в світовій практиці;
- обґрунтувати доцільність використання молекулярних методів у декоративній аквакультурі.

Об'єктом дослідження є молекулярно-генетичні підходи до ідентифікації статі у риб. *Предмет дослідження* – аналіз ефективності та практичного потенціалу різних ДНК-методів у сексуванні риб різних таксономічних груп, з урахуванням геномної специфіки та господарського значення.

Методи дослідження включають аналітичний огляд наукових публікацій, порівняльний аналіз методологій, інтерпретацію даних типування та статистичну обробку генетичних показників.

Наукові положення, винесені на захист:

- характеристика механізмів молекулярно-генетичного визначення статі у риб;
- критичний аналіз методів молекулярного сексування;
- оцінка ефективності SSR і SNP у контексті практичного застосування;
- формулювання рекомендацій для впровадження в аквакультуру.

Структура. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів основної частини, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи становить 65 сторінок, містить 3 таблиці, 1 рисунок, список із 44 джерел, серед яких – наукові праці, нормативні документи та публікації в міжнародних базах даних.

РОЗДІЛ 1. ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ СЕКСУВАННЯ РИБ

1.1. Статевий диморфізм у риб: поняття та біологічне значення

Статевий диморфізм – це явище, за якого самці й самиці одного виду відрізняються між собою за рядом морфологічних ознак та вторинних статевих характеристик, які не завжди пов'язані безпосередньо з процесом розмноження. Такі відмінності можуть проявлятися в розмірі та формі тіла, масі, забарвленні, малюнках на шкірі, а також у специфічних ознаках (наприклад, будова плавців або наявність зародкових горбків) та в особливостях поведінки [2]. Іноді поняття статевого диморфізму розширюють на відмінності в когнітивних або фізіологічних рисах між статями. Статевий диморфізм притаманний переважній більшості видів із чітким поділом на дві статі. У риб це явище широко поширене: дослідження показують, що помітні відмінності між самцями і самицями може спостерігатися у багатьох видів риб.

У риб статевий диморфізм найчастіше виявляється через розмірні та фізіологічні відмінності, колірне забарвлення та спеціалізовані вторинні статеві ознаки. По-перше, статевий розмірний диморфізм (SSD) означає, що одна стать (зазвичай самці або самиці) виростає більшою чи важчою. У багатьох видів риб більші розміри у самиць пов'язані з потребою формувати велику кількість ікри – їхній організм потребує більше ресурсів для розмноження. Водночас відомі види з більшим розміром самців; наприклад, у в'юнів (*Gobio gobio*) та деяких морських риб (*Brachaluteres ulvarum*) самці суттєво перевищують самиць у розмірах [5]. Уперше більший розмір самців пов'язують з конкуренцією за

партнерів та полігінією: у таких системах більші самці отримують більше шансів на успішне спарювання. Порівняльний аналіз ряду видів показує, що розмірні відмінності між статями можуть бути як позитивно, так і негативно спрямовані. По-друге, існують морфологічні особливості – форма тіла або її окремих частин. Наприклад, у багатьох риб самці мають видовжені або змінені плавці для залицяння або захисту гнізда. У морської медаки (*Oryzias dancena*), за даними експериментальних досліджень, практично всі виміряні лінійні розміри тіла і довжини плавців у самців виявилися більшими, ніж у самиць: вже на 70-му дні після вилуплення самці морської медаки виростають довшими, а їхні спинні й анальні плавці значно відрізняються довжиною від плавців самиць [8]. Іншим прикладом морфологічного диморфізму є розвиток особливих набряків або горбків у період розмноження (наприклад, потовщення плавців або шкіри у самців у деяких коропоподібних та окунеподібних риб). Третя форма – колірне розрізнення статей (секс-дихроматизм). У багатьох риб самці мають яскравіше забарвлення або візерунки на тілі. Класичним прикладом є гуппі (*Poecilia* візерунками, тоді як самиці мають однотонне сіре забарвлення; самиці гуппі чітко віддають перевагу помітним забарвленим самцям під час вибору партнера самиць. Колірні відмінності між статями є поширеними також у інших груп риб, наприклад в африканських цихлідах та жабоподібних риб, де самці мають більш інтенсивне або контрастне забарвлення під час нересту. Крім того, у риб спостерігаються різноманітні вторинні статеві ознаки – специфічні морфологічні утворення, пов'язані зі статевою роллю. У самців деяких видів риб уздовж тіла або плавців утворюються горбики, шипи чи потовщення, які використовуються під час шлюбних ігор або бійок між самцями [7].

Статевий диморфізм в риб, як і в інших тварин, вважається результатом взаємодії статевого та природного відбору. Класично вважають, що статевий відбір (конкуренція самців за самок і обрання самок найкращих самців) визначає багато рис – наприклад, яскраве забарвлення чи великі розміри самців виникають

через перевагу саме таких особин у шлюбних сутичках. Водночас сучасні дослідження показують, що й умови навколишнього середовища (тривалість пошуку їжі, хижацтво, густина популяції тощо) теж суттєво впливають на прояви диморфізму [13]. Наприклад, температура води часто є ключовим чинником, що визначає співвідношення статей у популяції при формуванні зародків; у багатьох видів риб температура інкубації ікри або споживання корму впливає на те, чи виросте зародок самцем чи самицею. Інші екологічні умови – щільність популяції, рівень кисню чи забарвлення дна – також можуть впливати на статеві пропорції або швидкість росту особин різної статі. Таким чином, екологічний контекст може змінювати не лише фізіологічний процес визначення статі, але й тривалий відбір диморфних ознак. Дослідження з *Salaria fluviatilis* (собачка прісноводний) показали, що в різних місцевостях (глибокі озера проти швидких річок) ступінь диморфізму змінюється залежно від середовища: там, де умови менш вимогливі (озера з багатими ресурсами), розмірні різниці між статями були менші, ніж у річках з іншим рівнем виснаження ресурсів і витрат енергії. Авторами зроблено висновок, що особливості середовища (обмеженість корму, тиск хижаків, швидкість течії тощо) регулюють, наскільки статевий відбір може виявлятися у вираженості диморфізму [20]. Інакше кажучи, у природі статевий диморфізм є компромісом між тиском природного відбору (вимоги виживання в даному середовищі) та статевого відбору (успішність розмноження) [34].

Розгляд конкретних видів ілюструє різноманіття проявів статевого диморфізму. Так, у багатьох промислових видів риб відомі статеві відмінності в рості: наприклад, у нільської тиліпії (*Oreochromis niloticus*) самці ростуть значно швидше і виростають більшими за самиць у тих же умовах вирощування [7]. Це стало підставою для популярної технології в декоративній аквакультурі – одностатевого вирощування, переважно самців, адже вони забезпечують кращий добовий приріст і вищу продуктивність. У прісноводних окуневих риб (*Percidae*), наприклад, самиці часто більші й живіші, тоді як у деяких лососевих самці навпаки мають більш хребетисту форму тіла та розвинений пектиральний горбок під час нересту, що пов'язують із шлюбною боротьбою (подібні особливості

відмічали в *Oncorhynchus mykiss*). Іншим яскравим прикладом є *Salaria fluviatilis*: тут самці відрізняються більшим тілом і головою, а самиці характеризуються вищими витратами на енергію для плавання під час нересту. Колірний диморфізм наочно проявляється у тропічних риб коралових рифів. Наприклад, у багатьох видів цихлід (лабіринтових риб), самці стають більш кольоровими чи набувають особливих плям у нерестовий період, тоді як самиці залишаються тьмянішими (симуляція ікри), що стимулюють самиць нереститися поблизу самця. Щодо дрібних риб – самці гуппі мають яскраві плями та смуги, якими вони привертають увагу самиць. У більшості *Poecilia reticulata*, самці вкриті контрастними візерунками, а самиці – маскувальним сіро-коричневим кольором поживу, тому самиці в природі часто віддають їм перевагу при виборі партнера. Є й екстраординарні приклади. Наприклад, у глибоководних вудильникоподібних самиці значно більші та мають біолоюмінесцентний апендикс для залучення здобичі, а самці після народження «прилипають» до самиці й перетворюються на крихітні паразитичні структури, втрачаючи незалежне життя [22]. Хоча подібні випадки належать до крайності, вони підкреслюють, що еволюційні шляхи формування диморфізму в риб дуже різні. У помірних широтах статевий диморфізм у риб рідше настільки виражений, але все одно може проявлятися у характерних рисах, наприклад, у риб-головачів або в'юнів, де розміри і нерестова поведінка формують розбіжності між статями (самці зазвичай більш агресивні і мають іншу форму голови).

Статевий диморфізм має велике практичне значення для розведення риб. По-перше, різниця в темпах росту та кінцевій величині статей безпосередньо впливає на продуктивність вирощування. У багатьох господарсько важливих видів саме одна стать забезпечує вищий прибутковий дохід: якщо, скажімо, самці тилапії більші й швидші, то зосередження на одностатевій популяції самців підвищує загальні показники вирощування [36]. Саме тому у тилапії та деяких

інших представників біотехнологій аквакультури використовують гормональну обробку чи генетичні методи (наприклад, YY-самців) для отримання майже суто чоловічих популяцій. Це запобігає небажаному нересту в карантинних умовах і дозволяє інвестувати ресурси в ріст самців, без витрат на ікру. Аналогічно, у видів риб, де самиці більші (наприклад, осетрові), практикують вирощування самиць для отримання більшої кількості ікри. По-друге, знання про статевий диморфізм допомагає селекціонерам відбирати кращі родини й контролювати статевий склад сімейств. Високопродуктивні популяції можна формувати, враховуючи гени, відповідальні за розміри та ріст кожної статі [38]. Завдяки відкриттю молекулярних маркерів статі і механізмів визначення статі у риб розроблені методики швидкої ідентифікації статі молоді (наприклад, PCR - диференціація самців і самиць за ДНК). Це дозволяє виводити моногенні лінії з бажаним статевим складом і виводити на ринок «моноспецифічний» товар (наприклад, всіх самок або всіх самців) з максимальним виходом м'яса чи ікри. Нарешті, статевий диморфізм впливає на поведінку риб у культивувальних системах. Оскільки риби часто почувають себе безпечною лише в групі однієї статі, змішані посадки можуть призводити до стресу, агресії чи пригнічення росту. Розведення одностатевих популяцій полегшує управління поголів'ям та зменшує міжвидову агресію. Крім того, у нерестових господарствах враховують диморфізм у поведінці: наприклад, для розведення стають у нагоді знання, що самці змагаються за територію, а самиці можуть бути більш вибагливі до умов інкубації ікри. Таким чином, статевий диморфізм використовується практично: він є критерієм відбору продуктивних особин і обґрунтуванням технологічних рішень. Якщо узагальнити: значна увага сучасних досліджень аквакультури приділена саме статевому диморфізму як чиннику, що визначає в кінцевому підсумку економічну ефективність рибництва [18]. Суттєві відмінності в рості та продуктивності між статями спонукають до впровадження нових біотехнологій, які дозволяють оптимізувати вирощування для комерційних цілей.

1.2. Методи визначення статі у риб

Знання статевого складу популяцій риб має вирішальне значення для селекційних програм, оптимізації обсягу промислу (наприклад, вирощування монокультури) та охорони рідкісних видів. Однак у багатьох видів статеві відмінності практично відсутні, особливо на ранніх стадіях розвитку, що ускладнює візуальне визначення статі [4]. Наприклад, для осетрів класичне візуальне сортування не дає потрібної точності. Тому були розроблені різноманітні методи – від простих морфологічних до сучасних молекулярних – для надійного встановлення статі риб.

Морфологічні методи базуються на спостереженні зовнішніх характеристик риб. При їхньому застосуванні здійснюють візуальний огляд тіла або статевих органів. Найхарактернішими ознаками є кількість і розташування статевих отворів, форма генітальної папіли, відмінності в забарвленні чи розмірах (статевий диморфізм) [2]. Так, у самиць деяких видів риб спостерігається три отвори в області ануса (анальний, генітальний та сечовий), тоді як у самців – лише два (анальний та спільний отвір для сечі й сперми). Крім того, у самців часто розвивається конусоподібна генітальна папіла за анусом, якої немає у самиць. Крім того, використовують морфометрію: статистичний аналіз співвідношень розмірів і формальних ознак. Так, у *Oryzias dancena* було показано, що самці мають довші спинні та анальні плавці і більше тіло, ніж самиці, що дозволяє розрізнити їх за стандартними метриками [6]. Використання цих ознак в аквакультурі найбільш поширене в зрілих особин. Проте ефективність методу обмежена: за даними для тиліпії, візуальне сортування за зовнішніми статевими ознаками давало точність лише 80–90 %. Це означає, що значна частина риб при такому методі може бути помилково ідентифікована за статтю. Крім того, морфологічний підхід непридатний для риб малої вікової групи, коли зовнішні розбіжності мінімальні, а також значно залежить від досвіду спостерігача.

Гістологічні методи передбачають аналіз тканинних зрізів гонад. Для цього виокремлюють гонади, фіксують та готують гістологічні препарати. Під мікроскопом вивчають будову клітин і тканин: наявність сперматозоїдів або

ооцитів, стадію їхнього розвитку (сперматогенез чи оогенез), можливі аномалії чи інтерсексуальність [3]. Гістологія є надзвичайно інформативною і забезпечує високу точність визначення статі, дозволяючи не тільки дізнатися «самець/самиця», але й оцінити стадію репродуктивного циклу індивіда. У деяких видів риб часто трапляється стадія «тимчасового яєчника»: у всіх риб на ранньому етапі формуються схожі на яєчникові тканини, які в половини особин дегенерують із подальшим розвитком. Наприклад, у *Danio rerio* первинні гонади у всіх риб спочатку подібні до яєчника, а потім у $\approx 50\%$ популяції відбувається відмирання ооцитів і формування сім'яників. Тому при інтерпретації гістологічних зрізів слід враховувати етап розвитку гонади [5]. У прісноводному рибництві гістологічні методи вважаються доволі ефективними – зокрема, дослідження осетрових показали, що мікроскопічне вивчення гонад забезпечує достовірний результат визначення статі. Гістологія є потужним інструментом у вивченні репродуктивної системи риб: її рутинно використовують для верифікації статі, визначення стадії розвитку гонад та документування статевих аномалій. Водночас, основним недоліком методу є руйнівний характер: рибу необхідно забити заради отримання зразків гонад [11]. Додатково, підготовка та аналіз гістологічних зрізів вимагає часу, спеціального обладнання і кваліфікованого персоналу.

Фізіологічні методи ґрунтуються на аналізі фізіологічних процесів і показників в організмі риб, зокрема на визначенні рівня статевих гормонів. У неінвазивних варіантах проводять забір крові або біологічних рідин і вимірюють концентрації таких гормонів, як 17β -естрадіол (жіночий статевий гормон), тестостерон, 11-кето-тестостерон та інші стероїди. Оскільки у самців і самиць статеві стероїди зазвичай мають різний рівень, аналіз гормонального профілю дозволяє ідентифікувати стать без шкоди для тварини. Наприклад, були розроблені методики, які на 93 % точності визначали стать у осетра лише за концентраціями циркулюючих статевих гормонів [17]. Перевагами гормональних методів є їхня неінвазивність та об'єктивність вимірювання. Однак слід зазначити недоліки: рівні гормонів сильно залежать від стадії статевого циклу,

фізіологічного стану і середовища. Наприклад, дослідники вказують, що у нерепродуктивний період морфологічні ознаки стають непридатними, а гормональні показники можуть різко змінюватись. Крім того, гормональні аналізи вимагають використання лабораторного обладнання (імунодіагностика, ЛЗА або мас-спектрометрія) і можуть бути дороговартісними [10]. У цілому фізіологічні методи добре працюють у поєднанні з іншими, проте не завжди дають однозначний результат за нестабільних умов.

Молекулярні методи включають широкий спектр генетичних та геномних підходів. Вони засновані на виявленні статевих хромосомних маркерів або відмінностей у ДНК/РНК між самцями та самицями. Одним із найпростіших підходів є використання поліморфізму повторів ДНК (маркери SSR, або мікросателіти) [1]. У деяких видів знайдені специфічні для однієї статі мікросателітні послідовності, наприклад локалізовані на Y-хромосомі тварин з системою XX/XY. Такі маркери можна ампліфікувати за допомогою PCR і швидко ідентифікувати стать індивіда. Крім того, розроблені поліморфізми за одиничними нуклеотидами (SNP): якщо відома геномна послідовність, порівняння ДНК самців і самиць дозволяє знаходити статево-специфічні SNP. За даними огляду, за останні роки близько половини досліджень статі риб використовують саме маркери на основі SNP/INDEL. Класичною молекулярною технікою є PCR: на її основі створюють специфічні праймери, пов'язаних зі статевою диференціацією, або ж використовують відомі статеві маркери (наприклад, маркер AllWSex2 у осетрів). За допомогою кількісної ПЛР (qPCR) можна не лише ампліфікувати специфічні ділянки ДНК, але й вимірювати рівень експресії генів, пов'язаних зі статевим розвитком [16]. В останні роки для виявлення генетичних статевих маркерів широко застосовуються методи геномного секвенування. Так, RAD-seq (секвенування ДНК у ділянках навколо рестрикційних сайтів) і ddRAD-seq (подвійне рестрикційне секвенування) дозволяють «на льоту» виявити сотні тисяч варіантів, включаючи статево-специфічні. Зниження вартості високопродуктивного секвенування призвело до того, що ~51% нових

досліджень з визначення статі риб використовують SNP INDEL-маркери. Аналіз РНК-секвенуванням (RNA-seq) застосовують для пошуку диференційованих за статтю генів у гонадах (табл. 1.1.): порівнюючи транскриптоми самиць та самців, вдається ідентифікувати ключові гени статевої диференціації (наприклад, *dmrt1*, *foxl2*, *amh* тощо). У переважній більшості випадків молекулярні методи дають найвищу точність і дозволяють визначати стать на дуже ранніх стадіях розвитку, коли морфологія ще однакова [18]. Водночас вони вимагають спеціалізованого обладнання, знання геномного контексту виду (для розробки маркерів) і можуть бути витратними на первинному етапі.

Таблиця 1.1.

Список генів, що визначають стать у видів променеперих риб

Ген	Повна назва гена	Хромосомна локалізація	Вид-носії
<i>amhr2</i>	Рецептор антимюллерового гормону 2 типу	аутосомна	<i>Takifugu rubripes</i> (Бурій скелезуб)
<i>amhy</i>	Y-зчеплений антимюллерів гормон	Y-хромосома	<i>Oreochromis niloticus</i> (Тиляпія нільська) <i>Esox lucius</i> (Щука звичайна) <i>Sebastes schlegelii</i> (Окунь темний)
<i>dmrt1</i>	Фактор транскрипції, пов'язаний із подвійною статтю та <i>tab-3</i>	аутосома / статева хромосома	<i>Scatophagus argus</i> (Звичайний аргус) <i>Cynoglossus semilaevis</i> (Китайський камбала)
<i>dmy</i>	DM-домен на Y-хромосомі	Y-хромосома	<i>Oryzias latipes</i> (Медака японська)

<i>gdf6Y</i>	Фактор диференціювання росту 6 на Y-хромосомі	Y-хромосома	<i>Nothobranchius furzeri</i> (Нотобранх Фурцера)
<i>gsdf</i>	Фактор, похідний від гонадної соми	аутосомна	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Райдужна форель)

Продовження таблиці 1.1.

<i>gsdf Y</i>	Фактор, похідний від гонадної соми на Y-хромосомі	Y-хромосома	<i>Oryzias luzonensis</i> (Філіппінська медака)
<i>sdY</i>	Статевий диморфізм по Y-хромосомі	Y-хромосома	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Райдужна форель) <i>Salmon salar</i> (Атлантичний лосось) <i>Salmo trutta</i> (Форель струмкова) <i>Salvelinus alpinus</i> (Арктичний голец)

Морфологічні методи (ультразвукове та ендоскопічне дослідження). Безінвазивні техніки дають змогу встановити стать без втручання в організм риб, що унеможлиблює потенційне травмування. Наприклад, ультразвукове сканування дозволяє візуалізувати форму гонад у живих риб – ця методика довела свою ефективність, особливо у великих видів і у осетрових. Лапароскопія передбачає малий хірургічний прокол і введення ендоскопа для безпосереднього огляду гонад. Хоча цей метод інвазивніший за УЗД, він дозволяє безпомилково ідентифікувати статеві органи у живих риб і часто застосовується для уточнення статі в експериментальних умовах у риб із невираженим статевим диморфізмом

Якщо порівняти то можна виділити основні переваги та обмеження кожного з методів:

- Морфологічні методи: Переваги: швидкі та дешеві, не потребують лабораторій чи забою риби. Вони особливо ефективні у видів з явним статевим диморфізмом у дорослому віці. Обмеження: велика похибка (лише ~80–90 % успішності при ручному сортуванні), залежать від статевої зрілості та досвіду професіонала, непридатні для молоді.

- Гістологічні методи: Переваги: максимально точні для встановлення статі й стадії розвитку гонад, можуть виявити інтерсексуальність або патологію [4]. Обмеження: руйнівні (потребують забою риби), трудомісткі і дорогі в плані часу та ресурсів.

- Фізіологічні методи (гормональні): Переваги: неінвазивні (аналіз крові або слинних виділень), дають об'єктивні кількісні дані і підходять для великих чи рідкісних видів риби. Обмеження: результати варіюються залежно від циклу, сезону та зовнішніх чинників; потребують лабораторних реактивів та обладнання. Інколи гомогенні рівні гормонів у різних статей ускладнюють інтерпретацію.

- Молекулярні методи: Переваги: надзвичайно висока точність, можливість визначення статі на ранніх стадіях (ще до морфологічної диференціації), сумісність з масовими високопродуктивними технологіями стартові затрати на розробку маркерів або секвенування генома, необхідність спеціалізованих знань і устаткування. Для деяких видів все ще не знайдено характерних маркерів, що ускладнює застосування цих методів.

Аналіз сучасної літератури свідчить, що останніми роками головним трендом у визначенні статі риби стало широке застосування геномних технологій. Високопродуктивне секвенування ДНК (NGS) – RAD-seq, ddRAD-seq, WGS – та інші методи дозволяють генерувати геномні дані для десятків тисяч особин і швидко виявляти специфічні маркери. З появою секвенаторів третього покоління

(PacBio, Oxford Nanopore) з'явилася можливість збирати високоякісні референсні геноми, що спрощує локалізацію статевих хромосом або ділянок, що відповідають за стать. Одночасно помітний інтерес до інтеграції методів: поєднання морфології з молекулярними підходами (наприклад, швидкий PCR-квантитативний скринінг за попередньо знайденими маркерами) чи застосування неінвазивного УЗД-сканування гонад як допоміжного інструменту [18]. У перспективі особливу увагу звертають на «оміксні» підходи (транскриптоміка, протеоміка) і розробку швидких полімеразних тестів (ті ж qPCR з плавкою кривою або цифровий PCR) для масового скринінгу особин. Важливе місце й надалі належить мультидисциплінарним стратегіям: поєднанню даних про генетику, гормони, морфологію і середовище. Підсумовуючи, найбільш прогресивними вважаються методи на основі аналізів ДНК, які з кожним роком стають дешевшими й ефективнішими, але в багатьох практичних випадках доцільно комбінувати кілька підходів з урахуванням цілі дослідження.

1.3. ДНК-технології як перспективний інструмент у генетиці риб

У XXI столітті науково-технічна революція в галузі геноміки сприяла появі потужних методів, здатних в корені змінити підходи до селекції риб. Це дозволяє регулярно отримувати повні геномні послідовності та одночасно аналізувати зв'язок між генотипом і фенотипом у популяціях риб. Завдяки цьому декоративна аквакультура перетворюється на галузь, котра значно виграє від впровадження ДНК-технологій: появи повноцінних референсних геномів, SNP-панелей та методів редагування геному [3]. Ці інструменти дають змогу прискорювати традиційний селекційний відбір, забезпечувати високу точність прогнозів генетичної цінності особин, а також впроваджувати інноваційні рішення для поліпшення продуктивності й адаптивних якостей промислових та декоративних видів риб.

За останні роки технології секвенування розвинулись настільки, що складні геноми риб зараз можна зібрати на хромосомному рівні з високою

точністю. Сучасні платформи наступного (Illumina) покоління секвенування (PacBio HiFi, Oxford Nanopore) дозволяють швидко і відносно недорого створювати високоякісний забір геномів. Наприклад, створені нещодавно хромосомні збірки геному тріски чорної (*Sablefish*) показують, що навіть у риб можуть досягати майже повної збірки з усіма хромосомами – те, що раніше було можливим переважно для організмів із простішими геномами [26].

Водночас з просуванням референсних збірок отримали розвиток методи масового генотипування. Використовуючи SNP-панелі та секвенування високої щільності (GBS, RAD-seq тощо), дослідники визначають безліч SNP по всьому геному риб. Ці дані застосовують у генетичному картуванні кількісних ознак (GWAS), підбираючи локуси, асоційовані з ростом, якістю м'язів, стійкістю до захворювань тощо [25]. Сучасні огляди відзначають, що GWAS стає рутинним інструментом у генетичних дослідженнях риб, а знайдені таким чином генетичні маркери використовують для маркер-асоційованого відбору (MAS) та оцінки генетичної цінності особин [28].

Однією з найактуальніших інновацій є застосування геномного відбору (genomic selection) в умовах декоративної аквакультури та рибництва. На відміну від традиційного відбору по родоводу, GS використовує тисячі SNP-маркерів для прогнозування сукупної спадкової цінності особин. Це дозволяє значно підвищити швидкість генетичних змін і точність відбору. Однак на практиці технологія GS впроваджена поки що тільки у провідних галузях аквакультури та в основних видів із розвиненою селекційною інфраструктурою (наприклад, атлантичний лосось, райдужна форель, короп, білоногі креветки і нільська тилапія) [12]. Головною перешкодою є висока вартість широкомасштабного генотипування великих поголів'їв. Для її подолання пропонуються різні стратегії: зокрема, створення низькощільних SNP-панелей з подальшою імпутацією пропущених генотипів за допомогою референсних даних [24].

Потенціал ДНК-технологій добре ілюструють і галузеві прогнози. Так, аналітики оцінюють, що широка адаптація редагованих ліній у таких ключових видів, як тилапія, атлантичний лосось чи білонога креветка, може додати до

аквакультури економічного прориву у розмірі 5–15 млрд доларів. За цих умов виробники очікують від генетичної модифікації поліпшення важливих показників: прискорення росту, кращої конверсії корму, підвищення якості м'яса та загальної продуктивності виробництва за зниження витрат. Слід зауважити, що редагування геному у риб є вже не лише науковою фантазією [22]. Наприклад, в Японії приватні компанії вирощують у промислових масштабах генетично відредаговані лінії жовтоперого тунця та інших видів з метою покращення швидкості росту та продуктивності.

Практичні результати застосування генетичних інструментів уже помітні у різних напрямках. Зокрема, завдяки геномному відбору створені види лосося та форелі із покращеною швидкістю росту і витривалістю. У нільської тилапії геномне картування дозволило ідентифікувати основні маркери, пов'язані з прискореним ростом та адаптацією до солоної води. Редагування генів імунітету у деяких видів лосося сприяло підвищенню стійкості до специфічних хвороб. Водночас технології ДНК-секвенування використовуються не лише для селекції, а й для генетичного моніторингу. Наприклад, метагеномне секвенування ДНК із зразків води допомагає відстежувати розподіл генетичних штамів у природних та культивованих популяціях [36]. ДНК-технології стають невід'ємним та надзвичайно перспективним інструментом в генетиці риб. За допомогою новітніх платформ секвенування створюються репрезентативні та глибоко анотовані геномні ресурси, що лягають в основу селекційних програм. SNP-аналіз і геномний відбір відкривають нові можливості для прогнозування спадкових якостей і підвищення продуктивності видів. І нарешті, геномне редагування значно прискорює процес отримання бажаних ознак, роблячи селекцію більш адресною та гнучкою [17]. Активне впровадження цих технологій у рибництво та декоративну аквакультуру має потенціал забезпечити стійке зростання продуктивності галузі, створюючи види риб з поліпшеними адаптивними властивостями за збереження екологічних гарантій. Емпіричні результати 2021–2024 рр. свідчать, що інтеграція геноміки у практику розведення риб не лише

реально здійсненна, але й швидко набуває практичної цінності для рибництва

Р

О

З

2

Д
І
Л
Методичні підходи до молекулярного сексування
2

• Зазвичай у риб складна й варіативна система визначення статі, а явних гетероморфних статевих хромосом більшість видів не має. Тому морфологічне визначення статі у деяких видів риб часто неможливе на ранніх стадіях розвитку, що ускладнює селекційну роботу і контроль популяції. Молекулярні маркери стали альтернативним рішенням: їх застосовують для ідентифікації статі риб задовго до статевої диференціації й без руйнування зразка. Розвиток генетичних тестів для сексування риб також має велике значення для виведення популяцій із потрібною статтю. У цілому, сучасні підходи спираються на пошук статевоспецифічних ДНК-послідовностей або експресійних відмінностей між самцями і самицями, використовуючи широкий набір методів молекулярної біології [15].

На початку молекулярні методи визначення статі базувалися на нецільовому скринінгу генома за допомогою поліморфних маркерів. Методи RAPD (довільно ампліфікований поліморфізм ДНК) та AFLP (поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів) генерують випадкові ДНК-фрагменти, серед яких іноді знаходять статевоспецифічні фрагменти [30]. Ці прості методи довели свою ефективність для первинного пошуку статевих маркерів, хоча в деяких видів на цих маркерах нічого не виявляли. Мікросателітні (SSR) маркери також використовувалися для генетичного маркування окремих хромосомних ділянок і знаходження зв'язаних із статтю локусів. З прикладів: для деяких риб

успішно виявлені CSAR-маркери (SSRs), які у самців і самиць відрізняються по алелям [21].

Для практичної ідентифікації статі отримані маркери зазвичай ампліфікують за допомогою PCR. Метод полімеразної ланцюгової реакції (PCR) передбачає використання праймерів, що зв'язуються зі специфічними ділянками геному. Наприклад, з секвенованих специфічних фрагментів отримують SCAR-маркери і проводять звичайну PCR—у самців і самиць при цьому з'являються різні за довжиною або наявністю фрагменти. PCR—RFLP (PCR з рестрикційним аналізом) дозволяє розрізняти поліморфізми шляхом обробки амплікона рестриктазами, що теж використовується для визначення статі при наявності SNP вона дозволяє оцінити дозу генів чи відмінності у кількості транскриптів між статями. Зокрема, було розроблено методи qPCR з аналізом плавлення продуктів (melt-curve) для генетичного визначення статі риб – наприклад, у осетра після ампліфікації статевоспецифічного маркера та аналізу плавлення праймер-діаграми. Усі ці підходи – PCR та його модифікації – залишаються базовими інструментами генетичного сексування риб [27].

Поряд з аналізом ДНК, проводять і аналіз РНК, адже диференціація гонад супроводжується специфічними змінами експресії генів. Порівняння транскриптомів яєчників та сім'яників (RNA-seq) дозволяє виявляти гени, які можуть брати участь у визначенні статі [35].

Флюоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) використовується для прямої візуалізації статевих хромосомних послідовностей на хромосомних препаратах. Наприклад, можна використовувати зональні або специфічні до X/Y хромосом зонди; це дає можливість встановити каріотипічну стать клітини. Хоч у риб більшість статевих хромосом морфологічно невидимі, FISH застосовували для підтвердження наявності/відсутності малих відмінностей: наприклад, за допомогою зондів до центромер X та Y визначають наявність Y-хромосоми у метафазних клітинах [40]. Завдяки FISH стає можливим локалізувати статеві маркери на хромосомах і довести їх зв'язок зі статтю.

Останнім часом для вивчення механізмів визначення статі все ширше застосовують методи генної інженерії, зокрема CRISPR/Cas9. Цей інструмент дає змогу точно редагувати гени статевої диференціації. Наприклад, нокаут шляхом CRISPR білка ароматази (*cyp19a1a*) в *Danio rerio* призвів до створення «чоловічої» популяції – вони не змогли нормально утворювати яйцеклітини. Це підтвердило критичну роль ароматази в жіночому розвитку. У прикладі з креветкою (*Exopalaemon carinicauda*) CRISPR-націлювання на ген гормону андрогенних залоз призвело до перетворення генетичних самців у фенотипових самиць [31]. Такі експериментальні результати демонструють: редагування генів може прямо змінювати статевий розвиток. З практичної точки зору CRISPR/Cas9 відкриває перспективи «сексуального перетворення» і контролю статі в декоративній аквакультурі, хоча потребує ретельної оптимізації [33].

Різні типи маркерних систем мають свої переваги та обмеження, які необхідно враховувати при виборі методики для молекулярного сексування риб (табл. 2.1.). В наступному підрозділі буде детально описано різницю між SSR та SNP-маркерами.

Таблиця 2.1.

Порівняльна ефективність методів молекулярного сексування для різних видів риб

Метод	Чутливість	Вартість	Швидкість	Придатність до масштабування
(INDEL)	Висока	Низька	Висока	Висока
	Дуже висока	Висока	Середня	Висока
SNP-аналіз	Висока	Середня	Висока	Висока
	Середня	Середня	Середня	Середня
	Середня	Низька	Середня	Низька

Порівняння ефективності різних маркерних систем

2.2.1. SSR (мікросателіти). Мікросателітні повтори – це короткі тандемні повтори ДНК (англ. STR, Short Tandem Repeats), відомі також як прості повторювані послідовності (SSR, Simple Sequence Repeats). Вони являють собою ділянки геному, де короткий нуклеотидний мотив (зазвичай довжиною 1–6 пар основ) повторюється поспіль багато разів. Як правило, мікросателіти складаються з 5–50 повторів одного мотиву. Мікросателіти характеризуються високою частотою мутацій внаслідок помилок реплікації (slippage), що веде до значної варіабельності довжини алелів [32]. Завдяки цій поліморфності мікросателітні локуси спричиняють велику генетичну різноманітність і стали цінними генетичними маркерами у дослідженнях ДНК.

Завдяки співдомінантній природі (наявності у диплоїда двох алелів, що обидва детектуються) та множинності алелів, SSR-маркери широко застосовуються при побудові генетичних карт, пошуку зв'язаних з ознаками локусів і встановленні родоводу тварин. В галузі молекулярного сексування саме мікросателітні маркери стали одним з перших інструментів для виявлення статевих хромосом або локусів, що визначають стать у різних видів риб.

Молекулярне сексування риб – це визначення генетичної статі особини на основі ДНК, без очікування розвитку фенотипових ознак статі. Для багатьох видів риб це актуально, оскільки статевий диморфізм у рості та інших господарських показниках є суттєвим. За традиційних методів визначити стать молоді риби складно (неінвазивно це можливо лише на пізніх етапах розвитку), тоді як генетичний підхід дає змогу дізнатися статевий генотип вже на ранніх стадіях розвитку особин [32]. Саме з цією метою були розроблені статеві ДНК-маркери у багатьох культивованих риб, зокрема на основі мікросателітів. Нині відомі SSR-маркери, що зчеплені зі статтю, для численних видів: африканського кларієвого сома, азійської аровани, товстолобика, коропа, райдужної форелі, атлантичного лосося, арктичного голця, камбали та багатьох інших. Нижче

наведено приклади застосування мікросателітів для ідентифікації статі у конкретних моделях.

Рід тиліяпій включає види зі складною системою визначення статі. Основним механізмом у нільської тиліяпії (*Oreochromis niloticus*) є XY-система (гетерогаметна стать – самець), проте в різних популяціях виявлено кілька різних статевих локусів та можливий вплив довкілля на співвідношення статей. Пошук ДНК-маркерів, що дозволяють відрізнити генотипічних самців (XY) від самиць (XX), активно ведеться з початку 2000-х років. Одним з перших успіхів було виявлення групи мікросателітних маркерів, зчеплених із головним локусом статі: десять SSR-локусів на певній зчепленій групі корелюють з фенотиповою статтю нільської тиліяпії [37]. Алелі, ймовірно специфічні для Y-хромосоми, дозволяли правильно передбачити стать ~95% нащадків у проаналізованих сім'ях. Це свідчило про наявність головного гена чоловічої статі поблизу маркерів з назвами UNH995 і UNH104. Водночас, у третій дослідженій сім'ї такого зв'язку не виявили, що вказало на складну природу статевої детермінації – можливу участь додаткових генів чи факторів довкілля. Надалі було знайдено й інші статеві маркери у тиліяпій. Зокрема, маркер під назвою Marker-5, локалізований на хромосомі (LG23) однієї зі штучно виведених ліній, дозволяє чітко розрізняти XX-, XY- і YY-генотипи за результатами PCR і електрофорезу. Це дає змогу виділяти так званих суперсамців (YY), яких потім схрещують з нормальними самицями (XX) для отримання 100% самців у потомстві (технологія GMT – дозволяє на ранніх етапах відбору визначити стать кожної особини і відбирати виробників з бажаними генотипами (наприклад, носії статевої хромосоми Y потрібного типу) для подальшої роботи. На практиці статеві SSR-тести в тиліяпії виконують на зразках плавників або м'язів: виділяють ДНК, проводять PCR з праймерами до статевих маркерів (напр., до алелі Y-хромосоми) і візуалізують фрагменти на агарозному гелі. Самці та самиці демонструють різні патерни алелів – наприклад, у самців з'являється додатковий фрагмент, притаманний лише Y-хромосомі, або навпаки відсутній певний “жіночий” фрагмент.

У більшості лососевих риб (родина *Salmonidae*) генетична детермінація статі відбувається за чоловічим гетерогаметним типом (XX – самки, XY – самці). Проте на відміну від ссавців, у різних видів і навіть популяцій лососевих статеві хромосома виникла незалежно і може бути різною. Ще на початку 2000-х було показано, що, наприклад, у атлантичного лосося (*Salmo salar*) статевий локус (умовно позначуваний як SEX) може знаходитися на різних хромосомах. Використовуючи панелі мікросателітних маркерів картували локус SEX у лініях атлантичного лосося: в залежності від походження риби, він міг бути зчеплений з хромосомою 2, 3 або 6. Це стало свідченням «стрибка» статевої детермінанти у еволюції лососевих – гіпотези, що один і той самий головний ген статі пересувається між різними хромосомами в різних лініях. Врешті, у 2012 р. було відкрито цей головний статевий ген – sdY (sexually dimorphic on the Y, аналог використовують PCR-тести на наявність гена sdY як більш прямий і надійний маркер. Однак внесок мікросателітів в цю історію важко переоцінити: саме SSR-маркери десятиліттями служили для складання генетичних карт і пошуку зчеплених зі статтю локусів у лососевих (наприклад, у райдужної форелі маркерів, специфічних для Y-хромосоми). У сучасних селекційних програмах з лососем мікросателіти також займають своє місце – їх використовують для ідентифікації генетичної статі виробників при створенні одностатевих (наприклад, суто жіночих) популяцій. Відомо, що в аквакультурі практикують отримання самок форелі (XX), що фенотипово розвинені як самці, для спаровування з нормальними самицями і отримання 100% генетичних самок у потомстві [14]. Підтвердити генотип таких «неправильних» самців (чи справді вони XX) можна саме молекулярно-генетично – відсутністю Y-специфічного маркеру або присутністю лише алелів самиць. Раніше для цього застосовували SSR-маркери Y-хромосоми, тепер – специфічні гени (наприклад, той же sdY). Водночас, SSR залишаються корисними для моніторингу спадковості: у складних схемах схрещування мікросателітні генотипи допомагають відстежити, від якого

самця походить певне потомство, та чи успадкували нащадки потрібний Y-хромосомний гаплотип.

Японська медака – невелика рибка, у якої вперше серед хребетних (поза ссавцями) був ідентифікований конкретний ген, що визначає стать. Медака має чітку XX/XY-систему: самці гетерогаметні (XY), самки гомогаметні (XX). При цьому морфологічно статеві хромосоми медаки слабо відрізняються, і виявити їх цитогенетично складно. Генетичні дослідження наприкінці 1990-х – початку 2000-х років із залученням маркерів призвели до картування статевого локусу на одній з найменших хромосом медаки. Було знайдено кілька зчеплених зі статтю маркерів, зокрема мікросателітних, позначених як SL1, SL2, B2.38 тощо. Врешті, у 2002 році група під керівництвом Міцуди виявила на Y-хромосомі медаки ген DMY (також відомий як *dmrt1bY*), що й виявився тригерним фактором формування чоловічої статі [18]. Цей ген є дуплікацією звичайного аутосомного гена DMRT1 і присутній лише в самців. Він визначає розвиток сім'яників, тому його наявність/відсутність однозначно вказує на стать особини. Після відкриття DMY з'явилися прості молекулярні тести на стать медаки (PCR на фрагмент гена DMY). Однак шлях до цього відкриття пролягав через класичну маркерну карту: саме SSR та інші маркери спочатку звузили область пошуку на Y-хромосомі до невеликого регіону. Таким чином, медака слугує прикладом того, як мікросателітні маркери допомагають ідентифікувати статеві локуси навіть у видів, де статеві хромосоми мало диференційовані.

Варто зазначити: окрім згаданих видів, SSR-маркери для визначення статі успішно розроблено для багатьох інших риб. Наприклад, у кам'яного окуня самців, що використовується для молекулярного сексування цього виду. У китайського окуня (*Siniperca chuatsi*) наявні статеві SSR-маркери, застосовувані у селекції для контролю за співвідношенням статей [7]. Такий перелік можна продовжити, але загальна тенденція є очевидною: прості повтори ДНК стали невід'ємною частиною досліджень статевої детермінації у риб, особливо тих, що мають значення для декоративної аквакультури.

Переваги SSR-маркерів для визначення статі:

- Висока поліморфність і інформативність. Мікросателітні локуси, як правило, мають багато алельних варіантів у популяції завдяки високим темпам мутацій (змінам числа повторів). Це дозволяє підібрати маркер, один з алелів якого чітко асоційований зі статтю. На відміну від бінарних SNP, SSR може мати унікальні алелі, наприклад, специфічний Y-хромосомний алель, відсутній у самиць. Наявність такого алелю у генотипі однозначно вказує на самця, що надзвичайно зручно для практики.

- Ко-домінантність і чітке розрізнення генотипів. SSR-аналіз виявляє обидва алелі у диплоїда, тому гетерозиготні (XY) і гомозиготні (XX або YY) особини можна розрізнити за результатами PCR. Наприклад, якщо самиця має генотип XX (обидва алелі “жіночі”), а самець XY (один “жіночий”, другий “чоловічий” алель), то на електрофореграмі у самця з’явиться додатковий фрагмент, відсутній у самиці [23]. Це спрощує інтерпретацію результатів порівняно з рецесивними маркерами, де присутність смуги означає гомозиготу.

- Широка доступність і простота. Для роботи з мікросателітами достатньо стандартної лабораторії молекулярної біології: потрібні тільки матеріал для виділення ДНК, праймери, ферменти для PCR та обладнання для електрофорезу. Багато видів риб вже мають розроблені набори SSR-маркерів; існують публічно доступні бази даних з послідовностями праймерів. Собівартість аналізу одного локусу невисока, що дозволяє застосовувати метод у масовому масштабі (наприклад, просканувати сотні мальків). Крім того, SSR-маркери нерідко можна переносити між близькими видами: праймери, розроблені для одного виду риб, іноді працюють і в споріднених видів, що розширює спектр застосувань методу.

- Можливість комбінування з іншими маркерами. SSR-аналіз не заважає використовувати паралельно інші методи. У практиці селекції часто поєднують мікросателітні та SNP-маркери: перші – для підтвердження

родоводів і контролю певних якісних ознак (таких як стать), а другі – для масивного геномного відбору за кількісними ознаками. Таким чином, SSR може бути органічною частиною комплексних програм генетичного моніторингу.

Обмеження та недоліки:

- Необхідність попереднього розвитку маркерів. Якщо для виду ще не знайдено статевого SSR-маркера, його потрібно спершу виявити і протестувати, що може бути тривалим процесом. Іноді локус, асоційований зі статтю, взагалі відсутній або змінний у різних популяціях (як у випадку тилляпії, де різні лінії мають різні статеві хромосоми). Це означає, що метод не завжди можна одразу застосувати “з полиці” – потрібні дослідження з картування статі.

- Ризик помилок ампліфікації. Як і будь-який PCR-аналіз, SSR-генотипування залежить від специфічності праймерів і якості ДНК. Null-алелі – одна з проблем SSR: якщо в ділянці зв’язування праймера сталася мутація, алель не ампліфікується і не видно на гелі. У такому разі гетерозигота може помилково виглядати як гомозигота, що спотворює результат. Для сексування це критично: помилка може призвести до неправильної ідентифікації статі. Тому при розробці маркера прагнуть обирати консервативні фланкуючі послідовності. Іноді доводиться підбирати альтернативні праймери, якщо виявлено часті null-алелі. Крім того, мікросателітні локуси схильні до явища “ступінчатих продуктів” (stutter) при PCR – побічних ампліконів на 1–4 пари основ коротших за основний сигнал, що може ускладнювати зчитування алелів.

- Обмежена універсальність і точність. SSR-маркери статі зазвичай прив’язані до конкретної генетичної системи виду. Якщо вид має нетипову або полігенну систему визначення статі, один маркер може бути недостатнім. Наприклад, навіть найкращий маркер у тилляпії прогнозує стать з точністю ~95%, але не 100%, через вплив інших факторів. У лососевих виявили

випадки невідповідності генотипу і фенотипу статі (~7–12% у деяких популяціях), спричинені перестановками статевого гена або присутністю його копій-псевдогенів [16]. Таким чином, SSR-метод може давати хибні результати в поодиноких випадках, особливо якщо статевий локус рухливий чи відбувається спонтанна зміна статі (як у деяких риб при дії температури або інших стресів). Для підвищення надійності нерідко використовують комбінацію декількох маркерів: скажімо, два незалежні SSR на різних ділянках статевої хромосоми, щоб ймовірність рекомбінації чи мутації одночасно в обох була мінімальною.

- Трудомісткість при великих обсягах. Якщо потрібно генотипувати тисячі особин за багатьма локусами, SSR поступається високопродуктивним SNP-методам. Хоча аналіз одного мікросателіта відносно простий, паралельне типкування десятків маркерів потребує більше зусиль: кожен локус вимагає окремих праймерів і оптимізації, результати потрібно інтерпретувати вручну або напівавтоматично. На щастя, для задач сексування зазвичай достатньо 1–3 маркерів, тож це менша проблема.

У сучасній генетиці риб простежуються кілька трендів, пов'язаних з застосуванням SSR та їх поєднанням з іншими методами:

- Поєднання SSR і SNP-маркерів. З поширенням панелей SNP та секвенування, мікросателітні маркери зайняли нішу точкових, перевірених маркерів для важливих ознак. У практиці селекції нерідко паралельно застосовуються обидва типи маркерів. Наприклад, статеві SSR-маркери можуть використовуватися для швидкого підтвердження статі або для ідентифікації носіїв потрібної хромосоми, тоді як сотні SNP застосовують для розрахунку племінної цінності за продуктивними ознаками. Таке доповнення забезпечує більш повну інформацію: SSR дають багато алельних варіантів для індивідуалізації генотипу, а SNP – охоплюють весь геном рівномірно [2]. У наукових дослідженнях також практикують інтегровані карти, що містять і

SSR, і SNP – для узгодження сучасних даних з попередніми напрацюваннями, здобутими ще на основі мікросателітів.

- Генетичний моніторинг і збереження різноманіття. Мікросателітні маркери продовжують відігравати важливу роль в екологічній та популяційній генетиці риб. В програмах збереження біорізноманіття SSR використовують для оцінки генетичної різноманітності популяцій, виявлення структурованості (поділу на підпопуляції) та відстеження змін генофонду з часом. На відміну від дорогих геномних аналізів, мікросателітний аналіз доступний за умов обмеженого фінансування, що важливо для моніторингу диких видів. Наприклад, у програмах відтворення осетрових і лососевих, випущені молоді особини маркують на генетичному рівні за допомогою набору мікросателітів – аби пізніше ідентифікувати їх серед вилову і оцінити виживання та змішування з дикими популяціями. У племінних господарствах контролюють рівень інбридингу, генотипуючи виробників за 8–12 SSR-локусами: це дозволяє розрахувати коефіцієнти спорідненості і уникнути близькоспорідненого схрещування при паруванні [4].

- Селекція та племінний відбір. SSR-маркери відкрили шлях до маркер-асоційованої селекції (MAS) у риборівництві ще до ери геноміки. У 2000-х роках з їх допомогою були картовані гени та QTL, пов'язані з ростом, витривалістю, хворобостійкістю в різних видів риб (лосось, тиляпія, короп та ін.). Вже впроваджено практичні MAS-програми, де за результатами генотипування відбирають молодняк з бажаними алелями. Наприклад, у атлантичного лосося MAS використовували для підвищення стійкості до вірусної анемії: риб з “резистентними” алелями SSR-маркера прищеплювали до груп нагульників. Хоча тепер на зміну цьому приходять геномна селекція (genomic selection) на основі тисяч SNP, мікросателіти не втратили значення. У станціях розведення, де немає доступу до дорогих чипів, як і раніше застосовують кілька SSR-маркерів для перевірки батьківських пар і відбору потомства [4]. Зокрема, статеві маркери – складова таких схем: дозволяють

прибрати небажану стать ще до початку вирощування, економлячи ресурси на вирощуванні непотрібних особин. SSR-маркери також інтегровані в програми створення нових ліній: ними користуються при аутбредних схрещуваннях для перевірки, що нова лінія достатньо відрізняється від існуючих (аналіз генетичної дистанції за мікросателітами).

- Нові підходи до типування SSR. Сьогодні спостерігається тенденція до автоматизації та підвищення точності SSR-генотипування. З'являються методики цифрового підрахунку повторів за даними секвенування (коли спеціальні алгоритми аналізують NGS-зчитування і визначають число повторів у кожному локусі [31]. Інший тренд – розробка мультиплексних PCR-наборів для специфічних задач. Наприклад, є комерційні набори STR для статевої ідентифікації та визначення видів риб (їх використовують у контролі якості і боротьбі з браконьєрством). В майбутньому очікується, що SSR будуть використовуватися у зв'язці з секвенуванням довгих зчитувань (методами типу Oxford Nanopore), що зможе одночасно давати дані і про кількість повторів, і про послідовності фланків та можливі мутації. Таким чином, мікросателітні маркери продовжують еволюціонувати як інструмент молекулярної генетики, зберігаючи свою нішу навіть за панування геномних технологій.

Молекулярне визначення статі за допомогою SSR-маркерів здійснюється за стандартним протоколом ДНК-аналізу, адаптованим до конкретного виду риб. Основні етапи цього процесу такі:

ідбір зразків та виділення ДНК. Для генотипування риб зазвичай відбирають невеликий зразок тканини, що містить ядра клітин. Найпоширеніші джерела ДНК – це шматочок плавця (плавниковий клин), фрагмент м'яза, шматочок зябрової тканини або крапля крові. Такі зразки легко отримати без шкоди для риби (мінімально інвазивно) навіть у ранньому віці. Зразки одразу консервують (у 95% етанолі, заморожують або висушують) для запобігання деградації ДНК. Далі геномну ДНК виділяють із тканини за допомогою стандартних методів – фенол-хлороформної екстракції, методики сольового

осадження або за набором реагентів для виділення ДНК. Важливо отримати достатню кількість якісної ДНК без інгібіторів PCR. Вихідний об'єм ДНК-екстракту зазвичай розраховують так, щоб мати ~50–100 нг ДНК на одну PCR-реакцію на кожен маркер.

изайн специфічних праймерів для SSR. Якщо статевий SSR-маркер для даного виду вже відомий з літератури, використовують опубліковані послідовності праймерів. У разі розробки нового маркера спочатку аналізують послідовності геному або бібліотек ДНК цього виду, щоб знайти мікросателіт, що відрізняється між самцями і самицями (наприклад, є у Y-хромосомі і відсутній у X). Визначивши таку послідовність, проектують пару праймерів в унікальних фланкуючих областях, що оточують повтор. Праймери зазвичай мають довжину ~18–25 нуклеотидів, температуру плавлення ~55–65°C і не повинні комплементарно зв'язуватися один з одним. Варто перевірити, чи праймери однозначно ампліфікують лише один локус (наприклад, скористатися BLAST-пошуком в геномі, якщо доступний, або провести пробні потребує тестування різних кандидатів. Нерідко під час оптимізації доводиться вносити зміни: зміщувати праймери далі від SSR, якщо близько до повтора виникають неспецифічні ефекти, або підбирати інші умови PCR. Для підвищення чутливості детекції один із праймерів інколи мітять флуоресцентною міткою на 5'-кінці – це дозволяє згодом автоматично детектувати амплікон на капілярному секвенаторі.

-ампліфікація мікросателітного локусу. Використовуючи розроблені праймери, проводять полімеразну ланцюгову реакцію. Компоненти стандартні: буфер, Mg^{2+} , дезоксинуклеозидтрифосфат (dNTP), термостабільна ДНК-полімераза (Taq або аналог), прямий і зворотний праймери, вода і ДНК-шаблон. Для більшості SSR підходять типові режими PCR: денатурація ~94–95°C (30 с), відпал праймерів 55–65°C (30 с) та елонгація ~72°C (30 с + 1 с на кожні 100 пар основ очікуваного продукту) – у 30–35 циклах. У разі неспецифічного ампліфікату коригують температуру відпалу або додають

стадію “touchdown”. Розмір PCR-продукту зазвичай невеликий (100 – 300 пар основ), що є плюсом, адже вимагає лише незначної кількості ДНК і ефективно ампліфікується навіть з частково деградованого матеріалу [3]. Для контролю в кожній реакції ставлять зразки від відомих самця та самиці, а також негативний контроль (без ДНК), аби уникнути хибно-позитивних результатів через контамінацію.

лектрофоретичне розділення та візуалізація алелів. Отримані PCR-продукти необхідно проаналізувати, щоб визначити їхній розмір (кількість повторів). Найпростіший підхід – гель-електрофорез. Амплікони пропускають через агарозний або поліакриламідний гель у електричному полі, де вони розділяються: коротші фрагменти рухаються швидше, довші – повільніше. Для мікросателітів, які різняться на лічені пар основ, кращою є поліакриламідна електрофореза (має вищу роздільну здатність). У гелі необхідно прогнати також маркер молекулярної маси (ДНК-сходи) відповідного діапазону, щоб точно оцінити розміри фрагментів. Після електрофорезу ДНК-фрагменти візуалізують. Існує кілька способів: класичне фарбування сріблом (дешево і безпечно, але менш чутливо), фарбування інтеркалюючими барвниками на кшталт броміду етидію (etBr) або GelRed (більш чутливо, проте etBr є токсичним), а також використання флуоресцентних міток [17]. Останній підхід нині найпоширеніший у високотехнологічних лабораторіях: один праймер містить флуоресцентний барвник, тож PCR-продукти світяться при лазерному збудженні. Такі зразки завантажують не на звичайний гель, а в автоматичний секвенатор, який здійснює капілярний електрофорез і детектує флуоресценцію кожного фрагмента, точно вимірюючи його довжину. Після розділення та фарбування результати оцінюють: для кожної особини перевіряють наявність алелей, специфічних для чоловічої чи жіночої статі. У найпростішому випадку шукають на гелі додаткову смугу (або пік на електрофореграмі) у самців, якої немає у самиць – це і є фрагмент Y-хромосомного алелю. В інших ситуаціях може аналізуватися комбінація алельних розмірів. Наприклад, у деяких риб

самці гетерогаметні, але обидві їхні алелі присутні і в самиць (перекриваються з жіночими діапазонами). Тоді для впевненого визначення статі доводиться генотипувати 2–3 різних маркери і інтерпретувати їх разом (скажімо, якщо особина гетерозиготна одночасно по двох певних SSR, ймовірність що це самець наближається до 100%) [21]. У будь-якому разі, практична інформативність SSR-аналізу статі залежить від чіткого розділення алельних варіантів між статями, що досягається належною валідацією маркерів на відомих вибірках і оптимізацією умов PCR та електрофорезу.

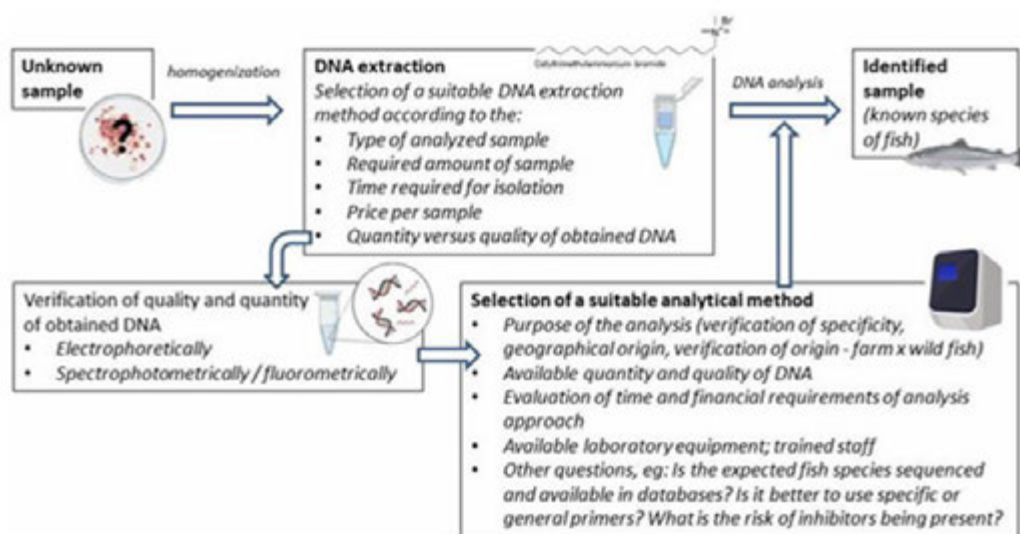


Рисунок 2.1. Схема загальної процедури з використанням методів на основі ДНК.

На завершення варто підкреслити, що метод SSR залишається одним з ключових у молекулярному арсеналі визначення статі риб. Він поєднує в собі достатню надійність, відносну простоту та невисоку вартість, а за правильної розробки і використання може дати точність, близьку до 100%. Мікросателітні маркери, відкриті в останні десятиліття, не лише допомогли розкрити генетичні механізми статевої детермінації у різних риб, але й стали невід’ємним інструментом прикладної іхтіогенетики – від селекції високопродуктивних одностатевих стадів до збереження генофонду диких популяцій.

2.2.2. SNP (однонуклеотидний поліморфізм). Однонуклеотидний поліморфізм (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) – це найпростіший і водночас найпоширеніший тип генетичної варіантності. По суті, SNP являє собою одиничну заміну нуклеотиду в геномній послідовності. SNP зустрічаються надзвичайно часто – в людському геномі в середньому кожні 100–300 пар основ, а в геномах риб їх також безліч. Завдяки такій присутності по всьому геному та біалельній природі (кожен SNP має два варіанти алелю) SNP-маркери стали одними з найпотужніших інструментів генетики, що дозволяють автоматизувати генотипування тисяч локусів одночасно [39]. В останнє десятиліття стрімкий розвиток методів секвенування нового покоління (NGS) зробив можливим виявлення мільйонів SNP у будь-якого виду, що особливо важливо для не модельних організмів, до яких належать і багато видів риб. Накопичення масштабних даних про SNP у риб та розробка високопродуктивних панелей генотипування (чіпів) вже трансформували дослідження в декоративній аквакультурі та популяційній біології риб.

Статеве визначення у риб – надзвичайно різноманітний та цікавий з біологічної точки зору процес. На відміну від ссавців, де статеві хромосоми чітко диференційовані (XY у самців, XX у самок), у риб еволюційно виникли різні системи. До того ж, у багатьох видів риб значну роль можуть відігравати зовнішні фактори (наприклад, температура інкубації може змінювати співвідношення статей) [4]. Через це в більшості видів риб відсутній універсальний «статевий» маркер. Проте ідентифікація генів або маркерів, пов'язаних зі статтю, має важливе практичне значення. Однонуклеотидні поліморфізми як маркери прекрасно підходять для цієї мети завдяки своїй кількості та можливості масштабного аналізу. Уже зараз генетики успішно застосовують SNP для пошуку локусів, що визначають стать риб, а також для швидкого молекулярного розрізнення статі особин у різних видів.

Пошук SNP, асоційованих зі статтю, вимагає продуманої стратегії, що включає кілька етапів. Загальний підхід можна описати такими кроками:

ідбір зразків. На початку відбирають репрезентативні групи особин обох

статей цільового виду (надійно визначених морфологічно або гістологічно). Бажано брати неродинних самців і самиць у достатній кількості (як правило, десятки і більше), щоб охопити природну генетичну варіацію. Також варто переконатися, що статева диференціація уже відбулася і зовнішні фактори не змінять статі цих особин надалі (унікають, наприклад, личинок у видів з можливим температурним впливом).

еквенування або генотипування. Наступний крок – отримання даних про геномні поліморфізми цих особин. Існують різні підходи: повногеномне секвенування (WGS) дає максимально повну картину варіацій, але є дорогим, тоді як методи типу *genotyping-by-sequencing* (GBS), зокрема RAD-Seq та його модифікації, дозволяють вибірково секвенувати тисячі локусів по всьому геному у багатьох особин одночасно з меншими витратами. Наприклад, при застосуванні RAD-Seq ДНК кожної особини розрізають рестриктазами, отримані фрагменти певної довжини секвенують, а потім порівнюють між самцями і самицями [40]. У випадку наявності геномної збірки виду можна також здійснити цілеспрямоване секвенування кандидатних ділянок (наприклад, зон статевих хромосом) або навіть екзомне секвенування.

обробка даних та виявлення SNP. Отримавши сирі дані секвенування (числові ряди *reads*), дослідники виконують біоінформатичну обробку для виявлення поліморфізмів. Якщо є зібраний референтний геном виду, зчитування вирівнюють (мапінг) на нього і проводять пошук варіантів нуклеотидів за допомогою спеціалізованих інструментів на кшталт GATK (Genome Analysis Toolkit). Для видів без готового геному використовують *de novo* підходи: наприклад, програмний пакет Stacks будує каталоги локусів та ідентифікує SNP всередині них у межах і між особинами. Результатом цього кроку є набір кандидатних SNP-варіантів по всьому геному і їхні генотипи у кожної дослідженої особини.

аналіз асоціації зі статтю. Далі з масиву виявлених SNP необхідно виділити саме ті, що пов'язані зі статтю. Для цього порівнюють частоти алелів у групах самців і самиць, виконуючи статистичний тест (наприклад, χ^2 або Fisher's

exact test) для кожного локусу. В результаті отримують перелік SNP, які або (a) достовірно диференціюються за алелями між самцями і самицями (наприклад, алель A зустрічається майже виключно в самців, а алель G – в самиць), або (b) зовсім специфічні для однієї статі (тобто присутні лише у самців чи лише у самиць) [8]. Останній випадок – ідеальний сценарій, бо такий SNP фактично виступає як повноцінний молекулярний тест для визначення генетичної статі. Якщо ж жоден окремих SNP не показує повної специфічності, але декілька мають сильну статистичну асоціацію, це може свідчити про полігенну природу статі (кілька локусів впливають на формування статі).

алідація маркерів. Коли кандидати статевих SNP знайдені, обов'язковим кроком є верифікація їхнього зв'язку зі статтю на розширеній вибірці або іншими методами. Наприклад, можна розробити алель-специфічні PCR-праймери для виявлення цих SNP і протестувати незалежні зразки самців/самиць. Успішний приклад – розробка швидкого PCR -тесту для генетичної ідентифікації статі канального сома на основі знайдених SNP: було підібрано праймери до ділянок з «чоловічими» нуклеотидами, що ампліфікували фрагмент лише в ДНК самців, і жодного в самиць. Також на етапі валідації нерідко з'ясовують, який конкретно ген або мутація лежать поряд із маркерним SNP – це дає змогу біологічно інтерпретувати результати (наприклад, SNP може знаходитися в гені, що кодує статевий гормон або фактор диференціації гонад, що прямо вказує на його функціональну роль).

Дослідження останніх років пролили світло на генетичну основу визначення статі в багатьох риб, і SNP-маркери відіграли у цьому ключову роль.

Нільська тілапія – відома риба в аквакультури, у якої система визначення статі довгий час залишалася незрозумілою через вплив як генетичних, так і температурних чинників. Сучасні популяції цієї риби мають складну полігенну систему: в різних штаммах статеві локуси знайдено на декількох різних хромосомах, причому співвідношення впливу цих локусів варіює [22]. Проте одним із головних відкриттів стало виявлення у 2014–2015 роках майстер-гену, відповідального за стать тілапії. Ним виявився дубльований ген анти-

Мюлерівського гормону на Y-хромосомі, названий *amhy* (anti-Müllerian hormone, Y). Цей статевий локус тілапії цікавий тим, що копія *amhy* майже ідентична звичайному гену *amh* на X-хромосомі, за винятком єдиної нуклеотидної заміни (C→T), яка призводить до заміни амінокислоти (Ser→Leu) у білковому продукті. Таким чином, відмінність у всього одного SNP фактично відділяє алель, що визначає чоловічу стать, від жіночого алелю. Це було переконливо доведено функціонально: нокаут гена *amhy* за технологією CRISPR/Cas9 викликав зміну статі генетичних самців (XY) на самиць, тоді як додавання копії *amhy* в геном генетичних самиць (XX) спричиняло їх перетворення на функціональних самців. Таким чином, у *O. niloticus* однонуклеотидний поліморфізм у гені *amhy* відіграє вирішальну роль у тригеруванні розвитку за чоловічим типом [13]. У рибництві це відкриття вже використовується для селекції «суперсамців» YY та отримання моноліній самців для гібридизації, оскільки самці тілапії ростуть швидше.

Ще один яскравий приклад – циногос напівлаєвий (*C. semilaevis*), морська камбалоподібна риба, у якої присутня жіноча гетерогаметність. Цей вид цікавий тим, що близько 14% генетичних самиць здатні змінювати стать і розвиватися як фенотипічні «псевдосамці». Такі псевдосамці мають генотип самиці, але морфологічно та функціонально є самцями (продукують тільки сперму, часто неповноцінну). В аквакультурі *C. semilaevis* поява псевдосамців небажана, адже вони знижують ефективність розведення. За допомогою SNP-аналізу вдалося розкрити генетичну природу цього явища [4].

Осетрові – давня група риб, що включає багато видів (рід *Acipenser*), відомі своєю цінною ікрою. В осетрових відсутній видимий статевий диморфізм до настання статевої зрілості, а генетична система визначення статі довгий час лишалася загадкою [25]. Ці риби не мають чітко диференційованих статевих хромосом. Додаткова складність – поліплоїдія: багато видів осетрових є еволюційними палеополіплоїдами (наприклад, руський осетер *A. gueldenstaedtii* має ~8 наборів хромосом) [37]. У 2021–2022 рр. дослідники провели повногеномне секвенування декількох самців та самиць руського осетра й стерляді, щоб виявити статеві відмінності на рівні SNP. Було знайдено понад

2,8 млн варіантів (SNP/інделів) загалом, з яких ~7400 показали статистично значущу асоціацію зі статтю в руського осетра. Картування цих «статевих» SNP на геном стерляді виявило ~15 кластерів (піків) – ділянок по 10 тис. пар основ, де сконцентровані десятки поліморфізмів, пов'язаних зі статтю [21]. На цій основі розроблено PCR-тест, який дозволяє однозначно генотипувати стать різних видів осетрів [16].

Крім наведених вище видів, дослідження статевих SNP проведено і для багатьох інших риб. Ось декілька цікавих випадків:

Channel catfish (каналний сом, *Ictalurus punctatus*). У цього сома генетична система – ймовірно XX/XY, але довго не було відомо, які гени задіяні. Нещодавно вчені виконали QTL-аналіз та цілеспрямоване секвенування кандидатної області і виявили 13 SNP, специфічних для самців. Шість з них призводять до амінокислотних замін у білку, що натякає на його роль у розвитку сім'яників. Ці SNP знаходяться на Y-хромосомі і відсутні у самиць, тож були використані для розробки PCR-діагностики статі, яка успішно розрізняє генетичних самців і самиць за наявністю специфічної ампліфікації у самців [28].

(атлантичний лосось). У атлантичного лосося виявлена, мабуть, найбільш «рухлива» система визначення статі. Різні популяції цього виду використовують різні локуси: проведено масштабний GWAS (~4700 особин, 46 тис. SNP), який показав три незалежні геномні області, асоційовані зі статтю. Усі вони містять копії гена sdY (sexually dimorphic on the Y), який вважається головним фактором чоловічої статі в лососів [9]. Фактично, еволюція неодноразово переносила sdY між різними хромосомами, і тепер у одного виду існують три «лінії» самців, кожна з яких визначає стать своїм місцем геному. Кожен з цих варіантів статевого локусу можна діагностувати набором SNP, тож у селекції лосося використовують панелі SNP для одночасного генотипування sdY-варіантів та відбору виробників з бажаними алелями.

(даніо-реріо). Ця маленька акваріумна рибка, відома як модельний об'єкт, також має цікавий випадок: у неї взагалі відсутня чітка генетична програма статі. Визначення статі даніо полігенне і сильно залежить від випадкових факторів

розвитку та середовища. Жодних статевих хромосом чи універсальних статевих маркерів не виявлено навіть після секвенування множини геномів. У різних лініях даніо ідентифікували кілька QTL, що впливають на співвідношення статей, але їхній ефект невеликий. Для практичних цілей це означає, що поки не існує SNP-тесту на стать для даніо, і визначити її можна лише ретроспективно (по фенотипу дорослої особини) [34]. Приклад даніо підкреслює межі застосування SNP: якщо ознака (стать) не має олігенного або моногенного контролю, навіть тисячі маркерів можуть не дати однозначної відповіді, а сама генетична природа залишається «невловимою».

Протягом 1990-х та 2000-х років найпопулярнішими молекулярно-генетичними маркерами у біології риб були мікросателіти (SSR, прості повторювані послідовності ДНК). SSR-маркери характеризуються високою поліморфністю (численними алелями різної довжини) та співдомінантністю, що робило їх зручними для задач від популяційної генетики до картування геному. Однак із розвитком секвенування та комп'ютерних методів все більше дослідників перейшли від десятків мікросателітів до тисяч і десятків тисяч SNP-маркерів. Основні переваги SNP над SSR можна підсумувати так:

- Повсюдність і кількість. У геномі будь-якої риби присутні мільйони SNP, рівномірно розподілені по всіх хромосомах. На відміну від мікросателітів, які зустрічаються рідше і зосереджені переважно в некодуючих ділянках, однонуклеотидні поліморфізми можна знайти практично в будь-якому гені або регіоні геному. Це дає змогу складати високовимірні панелі маркерів, що покривають весь геном, не залишаючи «білих плям».

- Висока відтворюваність генотипування. SNP є двоалельними варіантами із чітко визначеною нуклеотидною послідовністю, тому їх генотипування легко автоматизувати і стандартизувати між лабораторіями. Сучасні технології дозволяють одночасно генотипувати десятки тисяч SNP за допомогою ДНК-мікрочіпів (SNP-матриць) або методів масового

паралельного секвенування. Це забезпечує неймовірну продуктивність і точність. На практиці це означає, що аналіз 100–500 SNP уже може дати еквівалентну або кращу інформацію, ніж 10–20 мікросателітів, а використання тисяч SNP взагалі виводить точність на новий рівень [33].

- Простота обробки даних. Генотипи SNP представляються бінарними даними, що зручно для математичного аналізу великих вибірок. Існує багато готових інструментів для статистичного опрацювання SNP-даних, включно з оцінками генетичної диференціації, структури популяцій, асоціацій з ознаками тощо. У свою чергу, SSR-дані (довжини алелів) іноді важче безпомилково інтерпретувати і порівнювати між дослідженнями через можливі помилки типу «нульових алелів» або варіації умов PCR.

- Інформативність для асоціативних досліджень. Хоча кожен окремий SNP несе менше інформації (лише 2 можливих алелі проти десятків у SSR), великий масив незалежних SNP дозволяє точно оцінювати параметри генетичної різноманітності та структури популяцій. Наприклад, показано, що панелі з сотень нейтральних SNP дають більш чітке розмежування локальних популяцій риб, ніж класичні набори з кількох SSR [18]. Крім того, SNP, розташовані в генах, можна використовувати для виявлення слідів природного добору та адаптацій – аналізуючи розподіл алельних частот, можна виділити «аутлайерні» локуси, асоційовані з певними екологічними факторами. Мікросателіти, які зазвичай лежать поза генами, менш придатні для таких цілей.

Таблиця 2.2.

Порівняння ефективності різних маркерних систем

Критерій	SSR (мікросателіти)	SNP (однонуклеотидні поліморфізми)
Щільність у геномі	Менша щільність (1 на кілька тис. пар основ)	Висока щільність (1 на 100–300 пар основ)

Інформативність	Висока через множинність алелей	Середня, але компенсується кількістю SNP
-----------------	---------------------------------	--

Продовження таблиці 2.2.

Відтворюваність результатів	Нижча (залежить від методу електрофорезу)	Висока (результати легко автоматизуються і повторювані)
Застосування в сексуванні	Часто застосовується для знаходження асоційованих з Y-хромосоною маркерів	Висока специфічність до поліморфізмів, пов'язаних із статтю; придатні для GWAS
Складність аналізу	Потребує візуалізації через гелі або фрагмент-аналіз	Можливість повної автоматизації завдяки SNP-чипам або qPCR
Вартість	Відносно низька в лабораторному форматі, але не завжди масштабована	Вища на етапі розробки панелі, але дешевша при масовому генотипуванні
Потрібна кількість маркерів	Менша кількість (через багату алельність кожного SSR)	Потрібна більша кількість SNP для досягнення тієї ж інформативності
Потенціал для автоматизації	Обмежений	Дуже високий (використовуються масиви,
Застосування в інших дослідженнях	Хороші для філогенетики, ідентифікації особин, оцінки генетичного різноманіття	Підходять для GWAS, асоціацій з ознаками, картування генів, включаючи статеву детермінацію

Звісно, мікросателіти й досі використовуються – особливо в дослідженнях, де вже напрацьовані великі бази даних SSR-профілів (наприклад, для ідентифікації родинних зв'язків, оцінки генетичного різноманіття в рідкісних видів тощо). SSR мають сенс при невеликих масштабах аналізу або коли потрібна максимальна дискримінація між окремими особинами (за рахунок багатьох алелів). Втім, поступово навіть у цих сферах їх витісняють SNP. Наприклад, замість трудомісткого секвенування 10–15 мікросателітів у зразку нині простіше і дешевше генотипувати сотню SNP, отримавши сумарну, а то й більш точну інформацію. Для риб створено низку високодіагностичних SNP-панелей, здатних замінити SSR: зокрема, розроблено набір із 96 SNP для розпізнавання усіх 37 видів тілапій роду *Oreochromis* та їх гібридів, що значно полегшує моніторинг інтрогресії і гібридизації в природних популяціях [36]. Отже, переваги SNP як маркерів – масштабованість, універсальність і точність – роблять їх золотим стандартом сучасної молекулярної генетики, у тому числі й у дослідженнях статі.

Незважаючи на всі переваги, застосування SNP-маркерів не завжди гарантує успіх у розкритті механізмів визначення статі. Основні виклики виникають у випадках, коли статевий фенотип контролюється не одним головним локусом, а багатьма генами і чинниками (так зване полігенне визначення статі). В таких системах жоден окремий SNP не матиме вирішального впливу, і сигнал кожного окремого локусу може бути слабким [41]. Навіть дуже щільна панель SNP може дати лише розмитую статистичну асоціацію – для виявлення полігенних факторів потрібні великі вибірки і комплексні моделі. Як зазначалося, у модельного даніо-реріо генетичні механізми формування статі лишаються неясними, і навіть у цього добре вивченого виду не вдається виділити жодного надійного молекулярного маркера статі.

Ще одна проблема – епістатичні та екологічні впливи. У деяких риб наявність «чоловічого» генотипу може бути недостатньою для розвитку самця без певних умов середовища, або навпаки – сприятливі умови можуть частково

компенсувати генетичну відсутність такого гену. Прикладом є вже розглянутий температурних умов змінюють стать; тільки поєднання двох SNP дає змогу передбачити цю зміну [42]. Аналогічно, у нільської тілапії на базову XX/XY систему можуть нашаровуватися температурно індуквані зсуви статі – отже, навіть знаючи SNP *amhu*, для практики потрібно контролювати інкубаційний режим, інакше частина генетичних самців все одно перетвориться на самиць. В цілому, полігенні системи часто характеризуються поступовим пороговим ефектом: сумарна дія кількох генів (і, можливо, середовища) визначає стать організму. У таких випадках SNP-аналіз виявляє декілька локусів з невеликими ефектами. Наприклад, в згаданого атлантичного лосося було знайдено три незалежні локуси, кожен з яких відповідає за систему визначення статі в окремій лінії популяції [9]. Кожен з цих локусів сам по собі діє як «головний», але якщо розглядати вид загалом, то генетична основа статі фрагментована між ними. Така плюралістична ситуація ускладнює застосування маркерів: потрібні різні набори SNP для різних популяцій.

Додаткові труднощі виникають у видів з поліплоїдією та складними геномами. Як зазначено на прикладі осетрів, надлишок хромосомних наборів розмиває чіткість Менделєвої спадковості статі, а наявність кількох копій генів ускладнює генотипування (важко визначити, який з алелів на якій копії хромосоми знаходиться). У осетрових при аналізі ~7400 статевих SNP знадобилося картування на геном спорідненого виду, аби згрупувати їх в 15 кластерів і хоч якось локалізувати кандидатні області [38].

Отже, головне обмеження методу – він добре спрацьовує для оприлюднення чітких одно- або олігенних систем статі, але його інтерпретація стає складнішою в полігенних та лабільних системах. Тим не менш, навіть у таких випадках набір статистично асоційованих SNP проливає світло на загальну архітектуру системи (як у випадку лосося).

Роль SNP у генетиці риб продовжить зростати. З кожним роком стають доступними геноми нових видів, спрощуються та дешевшають методи

секвенування, з'являються мультивидові SNP-чипи (коли один набір маркерів охоплює відразу кілька споріднених видів). Все це розширює горизонти використання SNP. Можна передбачити, що невдовзі практично для кожного комерційно важливого виду риб буде створено свою високодіагностичну SNP-панель, яка включатиме і статеві маркери, і QTL основних селекційних ознак, і нейтральні маркери для відстеження походження. Поєднання таких панелей з роботизованим відбором та сучасними селекційними програмами дасть можливість ефективно керувати генетичними ресурсами риб, забезпечуючи і продовольчу безпеку, і збереження біорізноманіття [24].

2.3. Методи статистичної обробки результатів

Статистична обробка є невід'ємною складовою сучасних молекулярно-генетичних досліджень, особливо коли йдеться про вивчення маркерів, як-от однонуклеотидний поліморфізм (SNP) і мікросателіти (SSR), що використовуються для визначення статі у риб. Застосування статистичних інструментів дає змогу підтвердити валідність отриманих результатів й виявити тонкі закономірності, які не є очевидними при простому спостереженні. Такі підходи дозволяють оцінити зв'язок між генотипом і фенотипом, зокрема статю, а також ефективність і надійність використовуваних молекулярних маркерів.

Первинна обробка та візуалізація даних. Аналіз даних SNP (однонуклеотидний поліморфізм) та SSR (мікросателіти) починається з ретельної первинної обробки. Необхідно виконати фільтрацію генотипових даних для усунення шумів і похибок: видаляють маркери з великою кількістю відсутніх значень або низькою якістю генотипування. Зазвичай встановлюють порогові значення для долі успішних генотипувань (напр., не менше 95–97%) та мінімальної частоти мінорного алеля (MAF, minor allele frequency; зазвичай $> 0,01-0,05$). Наприклад, у дослідженні атлантичного лосося з 220 тисяч SNP-маркерів було відфільтровано маркери з частотою генотипування нижче 97% і $MAF < 0,01$, після чого для аналізу залишилося ~165 тис. SNP. Для SSR-маркерів

важливо контролювати наявність «нулів» (відсутніх алелей) та правильність визначення алельних фрагментів [7].

Після фільтрації здійснюють первинну візуалізацію та дослідження даних. Використовують діаграмні методи для оцінки розподілу алельних частот і гетерозиготності по кожному локусу. Часто застосовується аналіз головних компонентів (PCA) для виявлення структурованості вибірки або можливих викидів [10]. Також будуються графіки розподілу показників якості (наприклад, розподіл частки відсутніх даних по зразках) з метою виявити та виключити аномальні зразки.

Асоціація генотипу зі статтю. Основна мета статистичного аналізу – виявити зв'язок між генотипом маркерів та фенотипом статі. Для кожного маркера проводиться тест на асоціацію: порівнюють частоти алелів або генотипів у групах самців і самиць. Для автоматизації таких аналізів використовуються програмні інструменти на зразок PLINK або спеціалізовані скрипти мовою побачити ці піки асоціацій та визначити хромосомні регіони для подальшого вивчення .

Методи машинного навчання. Для підвищення чутливості аналізу й врахування комплексних взаємозв'язків між маркерами застосовують алгоритми машинного навчання (ML). Зокрема, широко використовуються метод ансамблевих дерев Random Forest («випадковий ліс») та метод опорних векторів для класифікації за статтю на основі багатовимірних генетичних даних [24]. Важливо, що на відміну від однофакторних тестів, ці алгоритми здатні враховувати взаємодії між множинами SNP і виявляти розподілені патерни, характерні для кожної статі. Наприклад, застосування градієнтного бустингу (алгоритм XGBoost) для геномних SNP дозволило передбачити фенотип статі райдужної форелі з точністю ~98%, навіть без попереднього відбору маркерів неінформативних SNP у моделі та ефективного навчання класифікатора на великих вибірках даних.

Інтерпретація та представлення результатів. Завершальним етапом аналітичного циклу є біологічна інтерпретація отриманих статистичних асоціацій і надання результатам зручної форми для обговорення. Якщо виявлено один або декілька сильно асоційованих маркерів, важливо визначити їхнє розташування у геномі та наявність поруч генів, потенційно пов'язаних зі визначенням статі. Наприклад, маркер, що показав найсильніший зв'язок, може знаходитися в гені-регуляторі статевого розвитку або в безпосередній близькості до нього [42]. У такому випадку доцільно провести додатковий аналіз цього гену – наприклад, секвенування, щоб виявити функціональні мутації, або експресійний аналіз для перевірки рівня його активності у самців і самиць. Якщо асоціації слабкі або відсутні, це може свідчити про полігенну природу статі або про те, що в вибірці відсутні ключові варіанти (наприклад, статевий ген відсутній у генотипованому масиві SNP) [20].

РОЗДІЛ 3. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ У СЕКСУВАННІ РИБ

3.1. Переваги та обмеження молекулярно-генетичних підходів

Нездатність розрізнити стать молоді риб не лише ускладнює селекційну роботу, але й може призвести до небажаного неконтрольованого розмноження в аквакультурі чи до дисбалансу статевого складу в програмах збереження видів. Відтак, розроблення швидких і надійних молекулярно-генетичних методів сексування є актуальним напрямом, що поєднує фундаментальні дослідження механізмів визначення статі з їх практичним застосуванням у рибництві та в декоративній аквакультурі [37].

Молекулярно-генетичні підходи до визначення статі риб мають низку суттєвих переваг порівняно з традиційними методами. По-перше, вони дозволяють ідентифікувати стать на ранніх стадіях розвитку – ще до настання статевої зрілості і появи зовнішнього диморфізму [35]. Це особливо цінно для видів, у яких зовнішні статеві ознаки відсутні або слабо виражені в молоді. Наприклад, в осетрових риб статеві відмінності стають помітними лише за кілька років, тоді як молекулярний тест здатен розрізнити самців і самиць ще у віці молоді. По-друге, генетичне сексування є високоточним: за наявності видоспецифічних ДНК-маркерів точність визначення статі може перевищувати 97–99% [28]. Такий рівень надійності було продемонстровано, зокрема, у нещодавніх дослідженнях з ідентифікації самців і самиць у промислових видів риб за допомогою PCR-аналізу статево-специфічних маркерів ДНК [29]. По-третє, молекулярні методи зазвичай малоінвазивні: для аналізу достатньо невеликого зразка тканини (фрагмент плавника або кілька крапель крові), що мінімізує стрес для риби та дозволяє застосовувати методи сексування навіть у межах програм збереження рідкісних видів [10]. На відміну від традиційних підходів (наприклад, візуального огляду гонад або хірургічного втручання), генетичний аналіз не завдає істотної шкоди особинам. Нарешті, молекулярно-

генетичні тести піддаються масштабуванню і автоматизації. Сучасні лабораторні технології дають змогу одночасно обробляти велику кількість зразків (високопродуктивні PCR в реальному часі, автоматизовані секвенатори тощо), що важливо при масовому сортуванні риб на господарствах [21].

Попри перелічені переваги, молекулярно-генетичні підходи мають і певні обмеження, які потребують врахування. По-перше, для розробки специфічного ДНК-тесту необхідно попередньо ідентифікувати статево-специфічні маркери для кожного виду. У багатьох риб відсутні морфологічно відмінні статеві хромосоми, тому генетичне визначення статі можливе лише після тривалих досліджень геному та пошуку ділянок ДНК, притаманних лише самцям або лише самицям [17]. Лише в останні десятиліття завдяки впровадженню секвенування нового покоління (NGS) стало можливим ефективно виявляти статеві маркери у риб на широкому геномному рівні [23]. Однак ці сучасні підходи також потребують доступу до секвенувального обладнання та біоінформатичного аналізу, що може бути недоступним для невеликих господарств [22]. По-друге, генетичні тести, розроблені для одного виду, не можна напряму застосувати до інших. Кожен вид риб характеризується унікальною системою визначення статі; навіть близькі таксономічно види можуть мати різні головні статеві гени або відмінні механізми їх регуляції [35]. Тому для кожного виду риб потрібна окрема наукова робота зі створення набору праймерів або зондів для PCR, що розпізнають саме її Y-специфічні послідовності. По-третє, деякі види риб проявляють гнучкість у формуванні статі під впливом довкілля. Наприклад, при температурно залежному визначенні статі або послідовному гермафродитизмі генетичний статевий маркер може не відповідати фенотиповій статі дорослої особини [34]. Відомі випадки, коли генетично жіночі особини під впливом підвищеної температури розвиваються як фенотипові самці – так звані псевдосамці. У таких ситуаціях простий ДНК-тест фіксує стать, але не враховує вплив середовища. Для коректної інтерпретації результатів може знадобитися комбінування молекулярного аналізу з іншими методами – наприклад, вимірювання рівня статевих гормонів або дослідження маркерів статі

(метилування ДНК у статеві-регуляторних генах) [36]. По-четверте, практичне впровадження молекулярних методів вимагає певної лабораторної інфраструктури і фахових навичок. Помилки при відборі проб або контамінація ДНК можуть призвести до хибних результатів, що особливо критично при масовому сортуванні мальків. Таким чином, хоча молекулярно-генетичні підходи й надзвичайно перспективні, слід зважено враховувати їх обмеження, адаптуючи методики до біологічних особливостей виду та забезпечуючи належний контроль якості генетичного аналізу.

3.2. Застосування ДНК-технологій у рибництві та аквакультури

Молекулярне визначення статі вже знаходить широке застосування у промисловому рибництві та декоративній аквакультури, сприяючи підвищенню ефективності виробництва, селекції та збереження генофонду цінних видів. Одним із ключових напрямів є використання генетичного сексування для отримання одностатевих популяцій риб у аквакультури.

Одностатеве вирощування має важливі практичні переваги: (i) запобігання неконтрольованому розмноженню в умовах вирощування, що особливо актуально для видів зі швидким настанням статевої зрілості, (ii) підвищення продуктивності за рахунок використання статі з кращими ростовими показниками [27], (iii) забезпечення однорідності поголів'я та високої якості продукції (у деяких видів самиці витрачають енергію на розвиток гонад, що погіршує товарні властивості – як спостерігається у самиць атлантичного лосося) статі або підбором пар для гібридизації, однак ДНК-технології надали альтернативні, більш керовані та екологічно безпечні підходи [19].

Одностатеві популяції, отримані за допомогою генетичного сексування та селекції, демонструють кращі виробничі показники. За даними виробничих випробувань, генетично чоловічі лінії тілапії забезпечують приріст маси та вихід продукції на 20–30% вище, ніж змішані стада, при значному зниженні ризику

перенаселення ставків через розмноження [30]. Подібні результати спостерігались і для інших об'єктів: популяції самиць райдужної форелі дають більший вихід філе високої якості, оскільки відсутні дрібні передчасно дозрілі самці, які сповільнюють ріст [38]. Такий контроль особливо важливий, якщо популяція отримана нетиповим шляхом (через інверсію статі батьківського покоління чи схрещування гібридів) і існує ймовірність певної частки “небажаних” за статю особин.

Іншою важливою сферою застосування молекулярно-генетичних методів сексування є проекти збереження видів та екологічний моніторинг. У випадку рідкісних чи зникаючих видів риб, яких розмножують в неволі для підтримки чисельності, знання статі кожного екземпляра є надзвичайно важливим. Генетичний аналіз ДНК дозволяє безпомилково розрізнити самців і самок, не завдаючи шкоди цінним особинам [40]. Такі методи вже застосовуються для видів, занесених до Червоної книги, з метою сформувати збалансовані за статю групи для розмноження в акваріумах чи риборозплідниках. Крім того, молекулярне сексування корисне при реінтродукції виду в дику природу: випускаючи молодь, біологи можуть обрати необхідне співвідношення статей, що підвищить імовірність успішного закріплення популяції в екосистемі.

Окремо слід відзначити екологічні та регуляторні аспекти використання одностатевих і стерильних популяцій риб у промислових цілях. Одним із способів запобігти небажаному розмноженню особин, які потрапили з штучних у природні водойми, є вирощування лише самців або лише самиць, залежно від біології виду [40]. Якщо такі риби випадково потрапляють у дику природу, відсутність протилежної статі не дозволить їм утворити самопідтримувану популяцію, що знижує ризик інвазійності та генетичного забруднення аборигенних видів [32]. Регуляторні органи деяких країн вже враховують цей підхід: для культивування екзотичних видів у відкритих садках може вимагатися доказ стерильності або одностатевості поголів'я. Молекулярні методи тут слугують інструментом контролю – наприклад, перевірки партій молоді на відсутність фертильних самиць перед видачею дозволу на імпорт партії риб. Ще

один напрям – генетична паспортизація та відстеження походження. Маркери, зокрема й статеві, використовуються для підтвердження виду та лінії риби у торгівлі (запобігання шахрайству з підміною виду) [13]. Хоч це і не прямо стосується визначення статі, але демонструє ширший контекст застосування ДНК-технологій у рибництві, де сексування може бути компонентом комплексного генетичного моніторингу аквакультурних популяцій.

3.3. Новітні технології та майбутні дослідження

Розвиток молекулярної біології та геноміки відкриває нові горизонти у технологіях визначення та контролю статі риб. Однією з ключових тенденцій є перехід від окремих маркерів до геномного підходу у вивченні статевих систем. Секвенування повних геномів все більшої кількості видів риб дозволяє виявляти головні гени визначення статі або крупні статевозчеплені ділянки ДНК [43]. Нещодавні дослідження із застосуванням високопродуктивного секвенування і біоінформатичного порівняння геномів самців і самиць дали змогу розробляти молекулярні тест-системи навіть для тих видів, у яких раніше було невідомо жодних маркерів статі. У майбутньому очікується створення своєрідних “генетичних карт статі” для головних промислових видів – каталогів генів і маркерів, пов’язаних з визначенням статі. Такі довідники спростять впровадження ДНК-сексування на практиці: замість багаторічних досліджень достатньо буде обрати відомий маркер з каталогу і налаштувати видоспецифічний PCR -аналіз [41].

Поряд з цим, розвиваються портативні та високошвидкісні технології генетичної діагностики, які зроблять сексування риб доступним безпосередньо в польових чи виробничих умовах. Вже продемонстровано принципово нові методи ампліфікації нуклеїнових кислот, що не потребують складного обладнання, такі як RPA/RAA (recombinase polymerase amplification) та LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Застосування RAA у поєднанні з візуальним зчитуванням результату на латеральних тест-смужках дозволило здійснювати визначення генетичної статі риб протягом ~30 хв без використання

лабораторного термоциклу – такий підхід випробовано на прикладі китайської камбали (*Synoglossus semilaevis*) для розрізнення генетичних самиць, самців та температурно інверсованих псевдосамців [15]. Подальший розвиток цього напрямку, ймовірно, приведе до появи комерційних наборів для експрес-сексування риб – компактних приладів або тест-смужок, якими іхтіолог чи біолог зможе швидко визначити стать прямо на місці вирощування. Наприклад, портативні PCR -аналізатори вже застосовуються в медицині та ветеринарії, а в недалекому майбутньому можуть бути адаптовані й для потреб рибного господарства. Це значно розширить охоплення технології: навіть малі господарства в віддалених регіонах зможуть скористатися перевагами молекулярного сексування без необхідності відправляти зразки в центральні лабораторії.

Не менш революційними є досягнення у галузі геномного редагування, які відкривають можливості не тільки визначати, але й цілеспрямовано змінювати або контролювати стать риб. Технології CRISPR/Cas9 та інші нуклеазні системи вже застосовуються для вивчення генів статі модельних та промислових видів. Наприклад, нокаут гена *foxl2* або *сур19a1* (ароматази) за допомогою CRISPR у ембріонів здатен спричинити розвиток генетичних самиць як функціональних самців у видів з гетерогаметною самицею, а вимкнення чоловічого визначального гена (*dmrt1*, *amhy* тощо) – фемінізувати генетичних самців [16]. Такі експерименти демонструють можливість повністю контролювати процес диференціювання статі на генному рівні. У перспективі, після всебічного оцінювання безпечності та ефективності, методи геномного редагування можуть знайти застосування у створенні “ідеальних” виробничих ліній риб. Замість багатоетапних схрещувань для отримання самців або неосамців можна буде прямо редагувати статеві хромосоми зародків, отримуючи потрібний генотип

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного оглядового дослідження за темою бакалаврської кваліфікаційної роботи «Молекулярне сексування різних видів риб» можна зробити такі висновки:

аналіз сучасної наукової літератури показав, що проблема визначення статі у риб має надзвичайну актуальність як у теоретичному, так і прикладному аспекті. В умовах розвитку сучасної декоративної та промислової аквакультури контроль статевого співвідношення дозволяє значно підвищити рентабельність виробництва, скоротити виробничий цикл та забезпечити високу якість кінцевої продукції.

Молекулярно-генетичні методи визначення статі, зокрема PCR, qPCR та ін. і секвенування нового покоління, демонструють високу специфічність і чутливість. Вони дозволяють ідентифікувати стать особин ще на ранніх стадіях розвитку, коли морфологічна диференціація ще не відбулася. Це відкриває можливості для раннього сортування молоді, а також ефективного формування ремонтно-маточних стад.

Проведений аналіз підтверджує, що сучасні методи сексування риб можуть бути як інвазивними (наприклад, біопсія тканин), так і неінвазивними (використання слизу, луски або навіть ДНК навколишнього середовища). Це особливо важливо для збереження рідкісних та зникаючих видів, де забір зразків не повинен шкодити особинам. Методи на основі аналізу ДНК дають змогу здійснювати моніторинг популяцій без фізичного контакту з об'єктами дослідження.

Практична значущість результатів дослідження полягає в тому, що отримані дані можуть бути використані для розробки стандартних протоколів визначення статі для декоративно важливих видів риб. Запропоновано інтегрувати методики молекулярного сексування у виробничі процеси рибогосподарських підприємств, що дозволить зменшити витрати на формування продуктивних стад

і підвищити вихід якісної продукції. Рекомендовано використання методики на базі діагностичних лабораторій для сексування риб у вищих навчальних закладів. Обґрунтовано доцільність подальших досліджень у напрямку впровадження біоінформатичних методів та штучного інтелекту для прогнозування статі риб за даними секвенування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ойко А. В. Молекулярно-генетичні маркери у селекції риб. *Біологія тварин*. 2021. Т. 23, № 2. С. 35–41.

2. Глушко П. М. Молекулярна діагностика статі в господарствах з вирощування тиляпії. *Агробіологія*. 2020. № 6. С. 27–32.

3. Ковальчук Д. В. Геномні технології увизначенні статі у риб. *Генетика і селекція*. 2023. № 1. С. 43–49.

4. Паламарчук Ю. П., Остапчук В. М. Сучасні методи визначення статі у риб. *Вісник аграрної науки*. 2020. № 11. С. 52–59.

5. A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia / M. Li et al. *Science*. 2019. Vol. 365, no. 6450. P. 1054–1058.

6. Amundsen T., Forsgren E. Male mate choice selects for female coloration in a fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. Vol. 98, no. 23. P. 13155–13160.

7. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics / D. Robledo et al. *Reviews in Aquaculture*. 2020. Vol. 12, no. 3. P. 1–19.

9. Current advances in sex determination and sex control in fish / A. Yano et al. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022. Vol. 73.

10. Davidson W., et al. e. Microsatellite-based sex identification in Atlantic salmon. *Aquaculture*. 2009. Vol. 286, no. 3-4. P. 221–225.

2023. Vol. 23. P. 453–470.

12. Devlin R., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 2002. Vol. 208, no. 3-4. P. 191–364.

13. Differing mechanisms underlie sexual size dimorphism in two populations of a sex-changing fish / M. I. McCormick et al. *PLOS ONE*. 2010. Vol. 5, no. 5. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010616>.

. 1990. Vol. 18, no. 22. P. 6531–6535.

16. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR Cas system / W. Hwang et al. *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31, no. 3. P. 227–229.

17. Environmental influences on sex determination and differentiation in fish: Implications for conservation and aquaculture / X. Zhang et al. *Frontiers in Genetics*. 2022. Vol. 13.

18. Fairbairn D. *Odd Couples: Extraordinary Differences between the Sexes in the Animal Kingdom*. Princeton University Press, 2013.

19. Genetic architecture of sex determination in fish: Applications to sex ratio control in aquaculture / P. Martínez et al. *Frontiers in Genetics*. 2014. Vol. 5.

raffelman J., Jain D., Weir B. S. A genome-wide study of Hardy–Weinberg equilibrium

21. Gutási A., Hammer S., El Matbouli M. Review: Recent applications of gene editing in fish species and aquatic medicine. *Genes*. 2023. Vol. 14, no. 4.

22. Hendry A., Berg O. K. Secondary sexual characters, energy use, senescence, and the cost of reproduction in sockeye salmon. *Canadian Journal of Zoology*. 1999. Vol. 77, no. 11. P. 1663–1675.

URL: <https://doi.org/10.1139/cjz-77-11-1663>.

23. Identification of fish species and targeted genetic modifications based on DNA analysis: state of the art / E. Čermáková et al. *Foods*. 2023. Vol. 12, no. 1. P. 228.

24. Janicke T., Fromonteil S. Sexual selection and sexual size dimorphism in animals. *Biology Letters*. 2021. Vol. 17, no. 9. P. 1

URL: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0251>.

25. Koyama T., al. e. Sex identification in *Lateolabrax japonicus* by Y-linked DNA markers. *Fish Genetics and Breeding*. 2021. Vol. 37, no. 2. P. 89–97.

26. Karoiller J. F., D'Cotta H., Saillant E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*. 2009. Vol. 3, no. 2--3. P. 118–135. URL: <https://doi.org/10.1159/000223071>.

27. Lee B., Hulata G., Kocher T. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*. 2004. Vol. 92, no. 6. P. 543–549.

etzker M. L. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010. Vol. 11, no. 1. P. 31–46.

30. Moghadam H., Ferguson M., Danzmann R. Sex-linked markers on the rainbow trout Y chromosome. *Genetics*. 2007. Vol. 177, no. 2. P. 1245–1256.

31. Mullis K., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987. Vol. 155. P. 335–350.

32. Ota K., Kohda M., Sato T. Unusual allometry for sexual size dimorphism in a cichlid where males are extremely larger than females. *Journal of Biosciences*. 2010. Vol. 35, no. 2. P. 257–265.
URL: <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0030-6>.

33. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. K. Williams et al. *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18, no. 22. P. 6531–6535. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
2013. Vol. 13, no. 5. P. 946–952.

35. Polymerase chain reaction (PCR): A short review / M. Rahman et al. *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J*. 2013. Vol. 4. P. 30–36.

36. Sato T. Active accumulation of spawning substrate: a determinant of extreme polygyny in a shell-brooding cichlid fish. *Animal Behaviour*. 1994. Vol. 48, no. 3. P. 669–678. URL: <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1286>.

37. Sex determination and differentiation in fish: genetic, genomic, and epigenetic perspectives / Y. Guiguen et al. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 36, no. 1. P. 5–31.
. 2015. Vol. 15, no. 3. P. 662–672.

39. The real-time polymerase chain reaction / M. Kubista et al. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006. Vol. 27. P. 95–125.

40. Tomás C., Ferreira I., Faria M. Codfish authentication by a fast short amplicon high resolution melting analysis (SA-HRMA) method. *Food Control*. 2017. Vol. 71. P. 255–263.

.

42. Warner R. R. Sex change and the size-advantage model. *Trends in Ecology & Evolution*. 1988. Vol. 3, no. 6. P. 133–136.

0

2

31994. Vol. 20, no. 2. P. 176–183.

.

V

o

1

.

2

3

.

P

.

4

5

3

—