

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ, БІОХІМІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

ГЕНЕТИКА РИБ

Ч. 1. Детермінація та диференціація статі у риб

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до самостійної роботи
з курсу «Генетика риб»
для студентів
другого (магістерського) рівня вищої освіти

ОДЕСА
ОНУ
2024

УДК 575.639.3
Г34

Укладач:

О. Л. Січняк, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики.

Рецензенти:

В. П. Герасимюк, кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

Ю. В. Караванський, старший викладач кафедри зоології, гідробіології та загальної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

*Рекомендовано вченою радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 1 від 28 серпня 2023 р.*

Г34 **Генетика риб. Ч. 1. Детермінація та диференціація статі у риб**
[Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. до самост. роботи з курсу
«Генетика риб» для студентів другого (магіст.) рівня вищ. освіти /
уклад. О. Л. Січняк. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2024. –
38 с. – 0,8 МБ.

Методичні рекомендації розроблені відповідно до вимог програми з дисципліни «Генетика риб». Мета видання – допомогти студентам засвоїти розділ «Генетика статі» та якісно підготуватися до семінарських занять. Методичні рекомендації містять перелік теоретичних питань і контрольних запитань по темам семінарських занять, базові теоретичні відомості для підготовки, завдання для самостійного опрацювання окремих питань, перелік допоміжної літератури.

Призначені для здобувачів другого рівня вищої освіти за спеціальностями 091 «Біологія», 162 «Біотехнології та біоінженерія».

УДК 575.639.3

ЗМІСТ

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	4
ДЕТЕРМІНАЦІЯ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СТАТІ У РИБ	6
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ	32
ЗАДАЧІ	32
ЗРАЗКИ ТЕСТІВ	33
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	37

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Навчальна дисципліна «Генетика риб» (курс за вибором) є складовою освітньо-професійних програм зі спеціальностей 091 «Біологія», 162 «Біотехнології і біоінженерія» другого рівня навчання. Курс є складовою багаторівневих підходів до вивчення живого і тісно пов'язаний із іншими дисциплінами, що складають фундамент біологічних наук. Навчальна дисципліна «Генетика риб» базується на дисциплінах ОП з питань цитології, біохімії, генетики та молекулярної біології, зоології, фізіології людини та тварин, екології та гідроекології і закладає підґрунтя для подальшого засвоєння студентами знань та вмінь з дисциплін другого рівня підготовки зазначеної ОП.

Завдання курсу полягає у формуванні у здобувачів уявлення про особливості успадковування якісних та кількісних ознак, генетичні особливості реакції риб на хвороби, розуміння генетичних процесів у популяціях риб, особливостей цитогенетики різних систематичних груп як відображенням еволюції окремих груп риб та рибоподібних. В процесі вивчення курсу здобувачі мають оволодіти методами генетичних досліджень, спрямованими на дослідження риб та рибоподібних, одержати необхідні теоретичні знання і практичні навички, необхідні для формування грамотного спеціаліста-біолога.

У результаті вивчення даного курсу студент повинен

знати: характер успадковування якісних і кількісних ознак риб на морфологічному, фізіологічному, біохімічному та молекулярному рівнях, особливості генетичних процесів в популяціях риб та шляхи еволюції даного класу тварин.

вміти: аналізувати біологічні явища та процеси на молекулярному, клітинному, організменному, популяційно-видовому та біосферному рівнях з точки зору фундаментальних загальнонаукових знань, а також за використання спеціальних сучасних методів досліджень.

Дані методичні рекомендації присвячені детермінації та диференціації статі у риб. В них наведена сучасна інформація про механізми детермінації та диференціації статі у променеперих риб. Це лише

частина розділу, але у такій еволюційно стародавньої, численної та різноманітної групи організмів в межах навчального матеріалу неможливо охопити усі особливості визначення статі. В той же час генетика онтогенезу є галуззю генетики, що бурхливо розвивається. Багато даних останнім часом отримано на окремих видах променеперих риб. Ці відомості демонструють роль окремих генів у детермінації та диференціації статі, складні зв'язки між зазначеними генами, генотип-середовищні взаємодії і, навіть, зв'язки на організменному рівні. До того ж, розвиток генетики статі риб обумовлений практичними потребами аквакультур, зокрема проблемами регулювання статі. Наведені опорні відомості є загального характеру. Більш детальну інформацію про притаманну багатьом видам коралових риб, а також деяким бичковим риbam, природну зміну статі в онтогенезі можна знайти в наведеній наприкінці літературі. Тому є нагальна потреба у даних методичних вказівках для поліпшення якості самостійної роботи здобувачів.

ДЕТЕРМІНАЦІЯ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СТАТІ У РИБ

Мета: сформулювати уявлення про механізми детермінації та диференціації статі у риб та способи практичного використання зазначених механізмів в аквакультури.

Теоретичні питання

1. Статеві хромосоми та їх роль у визначенні статі.
2. Вплив генетичних систем та епігенетичних факторів на детермінацію статі.
3. Вплив генетичних систем та епігенетичних факторів на диференціацію статі.
4. Успадковування, зчеплене зі статтю.

Опорні відомості

Перелік скорочень

Amh – антимюллерів гормон

Amhy – Y-пов'язаний антимюллерів гормон

AR – рецептор андрогену

E – естроген

ER – рецептор естрогену

FSH – фолікулостимулюючий гормон

GnIH – гормон, що інгібує гонадотропін

GnRH III – гормон, що вивільнює гонадотропін

HIF-1 – гіпоксично-індукований фактор-1

HPG – вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади

HSD – стероїдогенний феромент

LH – лютеїнізуючий гормон

T – тестостерон

Стать та механізми визначення статі

Стать – сукупність морфологічних і фізіологічних особливостей організму, що забезпечують статеве розмноження, сутність якого зводиться до запліднення – злиття чоловічих і жіночих гамет у зиготу.

ту, з якої розвивається новий організм. У вивченні статевого розмноження є безліч невирішених питань. Зокрема, дотепер обговорюються переваги і недоліки статевого розмноження в порівнянні з безстатевим, їх еволюційний зв'язок. Вважається, що асексуальні системи менш пристосовані до мінливих умов довкілля, нездатні ефективно елімінувати шкідливі мутації та мають відносно меншу тривалість життя. Навпаки, статеве розмноження дає кращі можливості для пристосування, забезпечуючи рекомбінацію батьківських наборів генів. З'являється і можливість зосередження шкідливих мутацій в одному геномі і їх наступного видалення.

Існує величезна різноманітність варіантів статевого розмноження і відповідних йому версій визначення статі, утруднена навіть їх класифікація. Звичайно кажуть про соматичну стать стосовно до соми (від грец. soma – тіло) – сукупність клітин багатоклітинного організму (крім статевих) – і гаметну стать, припускаючи перетворення первинної недиференційованої статевої клітини в зрілий сперматозоїд або яйцеклітину. Становлення соматичної і гаметної статі в різному ступені взаємозалежне у представників різних систематичних груп.

Розрізняють три основні типи визначення статі:

1. *Прогамний*, коли стать дочірнього організму визначається в ході гаметогенезу в батьківській особини.

2. *Сингамний*, коли стать особини визначається в момент злиття гамет.

3. *Епігамний*, коли стать особини визначається в процесі онтогенезу при вирішальному впливі зовнішніх факторів.

При прогамному і сингамному визначенні статі провідна роль належить статевим хромосомам. Вперше статеві хромосоми згадуються в роботі Г. Генкінга (1891), який при вивченні сперматогенезу клопа-солдатики виявив специфічний хроматиновий елемент, але помилково прийняв його за ядрце. Пізніше К. Мак-Кленг (1902) припустив, що цей елемент є додатковою хромосомою, яка виконує функцію визначення статі. Ці припущення надалі блискуче підтвердилися і тепер по імені клопа *Protenor belfragei* його називають *Protenor*-типом. Він зустрічається у деяких метеликів і хробаків і пов'язаний

з наявністю у самців лише однієї X-хромосоми (тип X0), а у самиць – двох X-хромосом (тип XX).

Найпоширенішим механізмом визначення статі є наявність у самців двох різних статевих хромосом – X і Y, а у самиць – XX. До такого типу відноситься більшість хребетних, багато безхребетних, у т. ч. плодова мушка дрозофіла, водяні клопи роду *Ligaeus*, по імені якого і названий даний тип визначення статі. Імовірно, в еволюційному плані *Protenor*-тип є похідним від *Ligaeus*-типу внаслідок втрати Y-хромосоми.

Особливий тип хромосомного визначення статі знайдено у птахів, волохокрильців, деяких метеликів, риб, амфібій, ряду квіткових рослин (наприклад, полуниці). У них гетерогаметною статтю є жіноча і самиці мають набір статевих хромосом ZW або Z0, у той час як самці – ZZ.

Прогамний тип визначення статі зустрічається рідко. Він характерний для тварин, у яких є чергування статевого і партеногенетичного поколінь (коловертки, горіхотворки, попелиці). Самиці, що партеногенетично розмножуються, відкладають великі й дрібні яйця. З перших розвиваються самиці, із других – самці. Виявилось, що яйця різняться каріотипово. Наприклад, у попелиці *Aphis oenotherae* великі партеногенетичні яйця мають $2n=10$ (8 аутосом + XX), а дрібні – $2n=9$ (8 аутосом + X0). Партеногенетичні яйця мають диплоїдний набір хромосом, тому що при їх утворенні відбувається тільки один поділ мейозу без редукції числа хромосом (усі хромосоми йдуть до яйцеклітини, і жодної у полярне тільце). У таких організмів партеногенетичне відтворення чергується зі статевим, яке здійснюється по сингамному типу.

Класичним прикладом епігамного типу визначення статі є морський хробак *Bonnelia viridis*. Із запліднених яєць цього хробака утворюються вільно плаваючі личинки. Якщо личинка осідає на дно, то вона розвивається у велику самицю, а якщо прикріплюється до хоботка статевозрілої самки і потім попадає в її порожнину, то, під гормональним впливом самки, розвивається в дрібних самців, які живуть у матці самиць.

Визначення статі у коралових рибок *Labroides dimidiatus*, більше відомих як губани, або чистильники, також залежить від відносин самців і самиць. Самець губана має гарем з декількох самок. У випадку його смерті одна з них починає міняти стать і, зрештою, перетворюється в самця. Правда, «перероджені» рибки є гермафродитами.

Слід розрізняти процеси визначення статі та процеси її розвитку в онтогенезі. При всіх типах визначення статі в онтогенезі відбувається статеву диференціація – розвиток первинних і вторинних статевих ознак. До первинних статевих ознак відносять морфологічні та фізіологічні особливості організму, які забезпечують формування певного типу гамет і їх з'єднання в процесі запліднення, тобто особливості в будові внутрішніх і зовнішніх статевих органів. Вторинні статеві ознаки мають істотне значення для забезпечення статевого процесу, але безпосередньо не пов'язані з гаметогенезом, спарюванням і заплідненням. Розвиток вторинних статевих ознак обумовлений гормональною діяльністю первинних статевих органів самиці або самця – яєчника або сім'яника.

Слід зазначити, що чітке розмежування між чоловічими та жіночими особинами характерно аж ніяк не для всіх живих істот. Гермафродитизм особливо характерний для організмів, що стоять досить низько на еволюційних сходах. До тварин, у яких існує лише одна стать, відносяться багато губок, кишковопорожнинні (медузи, коралові поліпи), багато черв'яків, а також деякі раки і риби.

З гормональним впливом зв'язані численні випадки впливу температури на формування статі. Визначальну роль у визначенні статі відіграє баланс статевих гормонів. Під час формування організму за розвиток ознак статі відповідають статеві гормони. У багатьох організмів жіночі гормони є похідними чоловічих. За перетворення відповідають певні ферменти, а їх активність залежить від температури. Тому нагрівання або охолодження яєць виявить ефект тільки в певний період розвитку ембріонів – на стадії, коли відбувається «вибір» між чоловічими і жіночими статевими гормонами.

Спеціалізація гонад, які розвиваються у сім'яник (тестис) або яєчник визначає наступну статеву диференціацію ембріона. Біологіч-

ною основою генетичного механізму визначення статі є бісексуальність ембріональних гонад ссавців. У прогонадах одночасно присутні Мюллерові та Вольфові протоки – зачатки статевих шляхів відповідно самиць і самців. Первинна детермінація статі починається з появи в прогонадах спеціалізованих клітинних ліній – клітин Сертолі. В останніх синтезується ефектор антимюллерівського гормону, відповідальний за пряме або опосередковане інгібування розвитку Мюллерової протоки – зачатка майбутніх фаллопієвих труб і матки.

Визначення статі у риб

Променепері риби мають найрізноманітніші репродуктивні системи та репродуктивні стратегії серед усіх видів хребетних. Це робить їх цікавою групою організмів для дослідження еволюції детермінації та диференціації статі. В них спостерігається широкий спектр репродуктивних систем – від гермафродитів до гонохористів, а також виявлені зміни статі у дорослих організмів. Це дає змогу аналізувати відмінності у структурі та експресії генів, відповідальних за детермінацію та диференціювання статі.

Незважаючи на складність та фенотипову пластичність розвитку гонад у променеперих риб, можна виділити загальні риси у механізмі розвитку гонад. Сім'яники та яєчники походять з біпотенційного зачатку гонад, який складається з декількох примордіальних зародкових клітин та соматичних клітин. Розвиток гонад починається з детермінації статі, яка є головним перемикачем. Визначення статі діє як головний перемикач шляху диференціювання біпотенційного зачатку гонад. Детермінація статі, в залежності від виду риб, може здійснюватися як генетично, так і під впливом довкілля, а також внаслідок взаємодії обох зазначених факторів.

Після детермінації статі, коли біпотенційний зачаток гонад починає свій розвиток як сім'яник або яєчник, процес розвитку гонад визначається статевою диференціацією. У променеперих риб статева диференціація лабільна і залежить від генів, гормонів та зовнішніх факторів протягом усього розвитку гонад. Гени, які беруть активну участь у диференціації статі, – це *amh*, *amhr2*, *amhy*, *dmrt1*, *cyp19a*,

figla, *gs* та *sox9*. Статева диференціація відбувається внаслідок взаємодії зазначених генів. Факторами навколишнього середовища, які впливають на статеву диференціацію, є температура, рН, щільність популяції, концентрація кисню та соціальний статус. Однак на цьому етапі участь факторів довкілля більше зводиться до підтримки активації або придушення різних чоловічих та жіночих шляхів залежно від статевої долі.

Відомо, що мозок відіграє істотну роль у регулюванні багатьох систем організму, включаючи репродуктивну систему. У променеперих риб мозок розділяється за статевою ознакою на чоловічий і жіночий, але має здатність змінюватися і адаптуватися. Хоча роль мозку у детермінації та диференціації статі досі погано вивчена, з'ясовано, що нокаут гена, який кодує гормон, що вивільнює гонадотропін III (GnRH III), сприяє формуванню чоловічої статі. Під час статевої диференціації гормони лютеїнізуючого гормону (LH) та фолікулостимулюючого гормону (FSH) не впливають на диференціювання сім'яників або яєчників, але обидва гормони необхідні для синтезу статевих гормонів, що регулюють статеву диференціацію. Отже, це показує участь мозку у визначенні та диференціації статі.

Регулювання детермінації статі

Генетичні фактори

Генетична регуляція детермінації статі променеперих риб широко вивчалася. З'ясовано, що вона може знаходитися як під моногенним контролем (медака японська, *Oryzias latipes*), так і під полігенним (данію реріо, *Danio rerio*). Слід зазначити, що цей процес не дуже консервативний та видоспецифічний. У променеперих риб ідентифіковано кілька генів, що визначають стать. У табл. 1 та у подальшому тексті наведено їхній перелік та опис.

Список генів, що визначають стать, у видів променеперих риб
[по Rajendiran et al., 2021]

Ген	Повна назва гена	Хромосомна локалізація	Вид-носії
<i>amhr2</i>	Рецептор антимюллерового гормону 2 типу	аутосомна	<i>Takifugu rubripes</i> (Бурий скелезуб)
<i>amhy</i>	Y-зчеплений антимюллерів гормон	Y-хромосома	<i>Oreochromis niloticus</i> (Тиляпія нільська)
			<i>Esox lucius</i> (Щука звичайна)
			<i>Hypoatherina tsurugae</i>
			<i>Sebastes schlegelii</i> (Окунь темний)
<i>dmrt1</i>	Фактор транскрипції, пов'язаний із подвійною статтю та <i>mab-3</i>	аутосома / статева хромосома	<i>Scatophagus argus</i>
			<i>Cynoglossus semilaevis</i>
<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>
<i>gsdf</i>	Фактор, похідний від гонадної соми	аутосомна	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Райдужна форель)
<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)

У ссавців зв'язування антимюллерового гормону (Amh) з його рецептором (рецептором антимюллерового гормону типу 2; Amhr2) активує подальші події, які запобігають розвитку мюллерових протоків у матку та фалопієві труби. Ген *amhr2*, класифікований як ген детермінації статі, у риб вперше був ідентифікований у *Takifugu rubripes*. Промотор гена *sup19a* з сайтами зв'язування SMAD4 активується, коли Amh зв'язується з Amhr2.

Y-пов'язаний антимюллерів гормон (Amhy) – це білок з суперсімейства трансформуючого фактора росту- β (TGF- β), він не є фактором транскрипції. Ген *amhy*, розташований на Y-хромосомі і є дуплікацією аутосомного гена *amh*. Променепері риби не мають мюллерових протоків, отже білок Amhy не може інгибувати їхнє утворення, натомість він регулює експресію генів *foxl2* і *sup19a1a* і відіграє критичну роль як ген детермінації статі у самців риб. Ген *amhy* був виявлений як ген детермінації статі у *Odontestes hatcheri* і, зовсім недавно, у тиліпії нільської, *Hypoatherina tsurugae*, щуки та окуня темного.

Ген *dmrt* (*doublesex and mab-3 related transcription factor*) – дуже консервативний ген, що класифікується по ДНК-зв'язувальній ділянці, відомої як домен DM. Більшість ссавців мають більше одного гену *dmrt*, всього у них виявлено вісім функціональних генів – *dmrt1* ... *dmrt8*. У променеперих риб виявлено шість варіантів – *dmrt1* ... *dmrt6*. Проте не всі вони беруть участь у розвитку гонад. Ген *dmrt1* ідентифікований як ген-кандидат визначення статі у *Scatophagus argus* та *Synoglossus semilaevis*, і це єдиний ген, пов'язаний з детермінацією чоловічої статі у променеперих риб.

Ген DM-домена на Y-хромосомі (*dmy*) є першим ідентифікованим у променеперих риб геном, що детермінує стать. Крім того, *dmy* є видоспецифічним та головним геном, відповідальним за детермінацію статі у медаки японської. Ця риба гонохорична, тобто особина розвивається або у самку з яєчниками, або у самця з сім'яниками. Крім того, самці медаки японської мають гетероморфні статеві хромосоми XY. Навпаки, самка японської медаки має гомоморфні хромосоми (XX). Ген *dmy*, також відомий як ген *dmrt1by*, є чоловічим геном, який визначає стать у даного виду. Цей ген ідентифікований як дуплікація аутосомного гена *dmrt1* і локалізований в області Y-хромосоми, яка визначає стать. Так само ген *SRY/Sry*, який визначає стать у ссавців, походить від дуплікації аутосомного гена *Sox*. Це дозволяє припустити, що ген *dmy* виконує функцію, еквівалентну функції гена *SRY/Sry* ссавців, тобто визначає стать у медаки японських.

Локалізований в Y-хромосомі ген *gdf6Y* (growth differentiation factor 6) кодує білок *gdf6Y*, один із сімейства TGF- β . Білок *gdf6Y* є

секреторним лігандом, який бере участь у зростанні та диференціюванні ембріонів, що розвиваються. Ген *gdf6Y* розташований у області Y-хромосоми, яка детермінує чоловічу стать. На сьогоднішній день за даними секвенування геному ген *gdf6Y* класифікується як такий, що визначає стать, тільки у *Nothobranchius furzeri*.

Білок Gsdf (gonadal soma derived factor), один із сімейства TGF- β , кодується геном *gsdf6*. Вважають, що ген *gsdf* відповідає за детермінацію чоловічої статі. Крім того, він також відіграє критичну роль у регуляції проліферації та диференціювання зародкових клітин сім'яника. У променеперих риб хромосомна локалізація гена *gsdf* видоспецифічна. Відомо, що в роду медака (*Oryzias*) ген *gsdf* розташований або на аутосомі, як у медаки японської, або на Y-хромосомі, як у медаки філіппінської. Цікаво, що у медаки філіппінської ген *dmy* відсутній. З'ясовано, що функція гена *dmy* виконується геном *gsdf*, розташованим на Y-хромосомі (*gsdf^Y*). У райдужної форелі ген *gsdf* має аутосомну локалізацію (хромосома 6).

На Y-хромосомі виявлено також причетний до статевого диморфізму у променеперих риб видоспецифічний ген *sdY*. Він є у більшості видів лососевих (родина Salmonidae), включаючи райдужну форель, кумжу, атлантичного лосося та арктичного гольця. Ген *sdY* є дуплікацією гена інтерферон-спорідненого фактора 9 (*irf9*), який кодує білок Irf9, що бере участь у регуляції імунної системи.

Ген *SRY*, локалізований на Y-хромосомі є головним ініціатором розвитку яєчок у ссавців. Вважають, що він виник внаслідок дуплікації локалізованого на X-хромосомі гена *sox3*. Тому *sox3* може замінити його функцію, що було продемонстровано при індукції *sox3^Y* в гонадах трансгенних XX мишей, де він був здатний керувати розвитком сім'яників у відсутності гену *SRY*. У променеперих риб для створення нової Y-хромосоми ген *sox3^Y* може бути мобілізований незалежно, шляхом активування функції гена *gsdf* (критичного фактору чоловічого шляху диференціювання риб). Таким чином, ген *sox3^Y* еволюціонував як один із генів, що визначають стать, у видів, споріднених медаки.

Ген *sox3^Y* сам по собі або з іншими транскрипційними факторами, може керувати чоловічим шляхом розвитку безпосередньо або за допомогою регуляції стероїдогенними ферментами. Ген *sox3^Y* життєво важливий для сома на пізніх стадіях розвитку гонад та сезонного дозрівання. Крім того, білок Sox3 проявляє себе як активатор транскрипції гена *11 β -hsd* (ген стероїдогенного ферменту) шляхом зв'язування зі специфічними промоторними мотивами. Інші важливі функції гена *sox3^Y*, які проявляються в основному в гонадах, що розвиваються, і в головному мозку, відповідають формуванню гіпоталамо-гіпофізарної осі та диференціювання нейронів. Крім того, *sox3^Y* діє як супресор апоптозу у розвитку яєчників, вимагаючи розвитку фолікулів та плодючості у рибок данію.

Фактори довкілля

Роль довкілля у визначенні статі добре описана у рептилій, особливо у крокодилів та черепах, тоді як у променеперих риб про це відомо набагато менше. Найбільш відомими факторами навколишнього середовища, що беруть участь у визначенні статі, є температура, щільність популяції, гіпоксія, рН та соціальні взаємодії. Теоретично участь факторів довкілля у визначенні статі відбувається до критичного періоду статевої диференціації. Точний механізм того, як фактори довкілля регулюють визначення статі, залишається невивченим. Тим не менш, з'ясовані три можливі шляхи:

- фактори довкілля синергетично взаємодіють з генетичним механізмом визначенням статі;
- переважають над генетичним механізмом визначенням статі;
- є первинними та незалежно регулюють визначення статі.

Серед вищенаведених факторів температура є важливим елементом впливу довкілля на детермінацію статі у променеперих риб, хоча точний механізм цього впливу залишається незрозумілим. Вважають, що можливі два способи впливу температури на визначення статі. З одного боку, це може бути взаємодія з генетичною детермінацією статі. Відомо, що висока температура активує ген *dmrt1* і викликає переважання чоловічого шляху розвитку. З іншого боку, можливо, що

температура діє незалежно, викликаючи епігенетичні зміни у гені, необхідному для статевої диференціації. Висока температура викликає гіперметилування промотора гена *sup191a* і пригнічує його експресію, що призводить до популяції з переважанням чоловічої статі.

Крім температури, рН води також бере участь у визначенні статі променеперих риб, переважно із родини Cichlidae. Відомо, що рН визначає статевий розвиток *Apistogramma caetei*, *Pelvicachromis pulcher*, *P. subocellatus* та *P. taeniatus*. Показано, що кисла вода (рН < 7) призводить до появи чоловічої одностатевої популяції або популяції з переважанням чоловічої статі, тоді як нейтральна або лужна вода (рН ≥ 7) призводить до переважання у популяції жіночої статі. Тим не менш, точний молекулярний механізм того, як рН регулює визначення статі, залишається невідомим.

Також з'ясовано, що різна щільність популяції може впливати на визначення статі у променеперих риб. В уловах риби з дикої природи часто переважають самки, тоді як у неволі серед риб, що ростуть в обмеженому просторі і при високій щільності, переважають самці. Відомо, що гіпоксія – стан, при якому рівень розчиненого у воді кисню є низьким, пов'язана з щільністю риби в неволі. Висока щільність риб у неволі часто призводить до низького рівня розчиненого кисню. Недиференційовані гонади рибок данію при низькому рівні розчиненого кисню розвиваються переважно по чоловічому шляху у порівнянні з рибками, які мешкають у середовищі із середнім рівнем розчиненого кисню. На молекулярному рівні і щільність, і гіпоксія активують вісь стресу, або вісь гіпоталамус-гіпофіз-надниркові залози, і підвищують експресію кортизону. Перетворення кортизону опосередковано ферментом 11β-HSD, який бере участь у андрогенних шляхах, особливо на заключному етапі синтезу 11-оксигенованих андрогенів. Таким чином, підвищений рівень кортизолу призводить до підвищеного рівня 11-кетотестостерону, що індукує розвиток чоловічої статі.

У багатьох променеперих риб спостерігаються ювенільні гермафродити або біпотенційні гонади. На стадії розвитку більші мальки часто перетворюються у самців, тоді як дрібніші мальки диференці-

юються у самок. Однак у риб, виловлених у дикій природі, не виявлено кореляції між визначенням розміру та статі, хоча у неволі швидке зростання мальків призводить до маскулінізації. Точний механізм цього явища залишається незрозумілим.

Мозок відіграє життєво важливу роль регулюванні багатьох систем, включаючи репродуктивну систему. У ссавців, особливо в людей, мозок самців і самок відрізняється за статевою ознакою, тоді як у променеперих риб хоча мозок також диференційований за статевою ознакою, але має здатність змінюватися та адаптуватися. Добре відомо, що мозок регулює репродуктивну систему через класичну вісь – вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади (HPG). Проте попередні дослідження були зосереджені на виявленні нових генів, що визначають стать, у гонадах, сім'яниках і яєчниках. Тому виникає ряд питань. Чи бере мозок участь у визначенні статі? Якщо так, то які механізми задіяні? Чи відбувається детермінація статі у самців чи самок спочатку в гонадах, а потім у мозку відбувається статеве диференціювання, чи навпаки?

Загалом, регуляція осі HPG починається з секреції ключового гормону гіпоталамуса, гормону, що вивільнює гонадотропін (GnRH), декапептиду, який секретується з преоптичної області гіпоталамуса в портальну систему гіпофіза. Потрапляючи в гіпофіз, GnRH стимулює гонадотроф передньої частки гіпофіза до секреції гонадотропних гормонів, включаючи FSH та LH. Обидва гормони відповідають за регуляцію функцій як сім'яників, так і яєчників, стимулюючи синтез андрогенів та естрогенів, відповідно. Крім регуляції диференціювання та функції гонад, як LH, так і FSH діють як позитивні та негативні регулятори осі HPG. З'ясовано, що нейрони, які експресують GnRH (GnRH-нейрони), не експресують рецептор естрогену α (ER α) або рецептор андрогену (AR), отже, зворотний зв'язок статевих стероїдів передається клітинам GnRH шляхом регуляції на вищому рівні. Проте, нещодавно показано, що GnRH-нейрони у теляпії нільської експресують ER. У більшості променеперих риб знайдено три варіанти GnRH (GnRH I-III), а у деяких – лише два, а саме GnRH II та GnRH III. Використовуючи нокаут гена *GnRH III* (лінія *GnRH III* -/-) у рибок

данію вдалося зсунути співвідношення статей у популяції у бік чоловічої статі.

Більше того, відсутність гена *GnRH III* у рибок данію підвищує експресію генів, які беруть участь у розвитку чоловічих гонад, таких як *sox9a*, *amh* і *sur11*. Крім того, придушення гена *GnRH III* пригнічує проліферацію примордіальних статевих клітин, що є одним з факторів розвитку чоловічих гонад. Риби данію класифікуються як гонохоричні променепері риби; дорослі особини виглядають як самці або самки, але вони виявляють ювенільний гермафродитизм. Отже, можливо, що гонади рибок данію потенційно мають стати яєчниками, але через опосередкований ланцюг регуляторних впливів можуть переключатися на андрогенний шлях.

Регуляція статевої диференціації

Диференціація статі є продовженням процесу детермінації статі. Подібно до детермінації статі, диференціація статі включає складний механізм, регульований одним фактором або взаємодією між декількома факторами, включаючи генетичні фактори, фактори навколишнього середовища і мозок.

Генетичні фактори

Антимюллерів гормон (*Amh*) бере участь у диференціації чоловічої статі та розвитку жіночих фолікулів. Однак у деяких променеперих риб під час статевого диференціювання був відзначений негативний зв'язок між експресією *Amh* та ароматази. У рибок данію високі рівні *Amh* супроводжуються низькими рівнями *sur19a*, що дозволяє припустити, що *amh* є потенційним знижувальним регулятором гена *sur19a*. Пригнічення гена *sur19a* може призвести до передчасної трансформації яєчників у сім'яники.

У рибок данію мюллерові протоки і ген *amhr2* відсутній, але зберігається ген *amh*. Відсутність алелів гена *amh* у данію призводить до зсуву до жіночої статі. Мутантні дорослі риби данію мають великі сім'яники, половина з яких мають незрілі ооцити. Це показує, що ген *amh* контролює продукцію чоловічих статевих клітин та запобігає ро-

звітку або виживанню ооцитів. Мутантні самці, порівняно із самцями дикого типу, менш активні, щоб стимулювати самок дикого типу до відкладання яєць. Таким чином, ген *amh* має вирішальне значення для ефективності парування самців. Самки-мутанти утворюють сім'явивідні протоки, а деякі продукують потомство. Молоді самки-мутанти також відкладають кілька запліднених яєць, що свідчить про функціонування статевих протоків. Однак з віком вони стають безплідними, а отже, для постійної фертильності необхідний ген *amh*. Більш старі ще мають величезні, але стерильні яєчники із зібраними невітеллогенними фолікулами. Отже, ген *amh* не є життєво важливим для зростання репродуктивних протоків або ініціації утворення гамет у рибок данію. Тим не менш, він необхідний для проліферації та дозрівання фолікулів та підтримки фертильності у самців та самок. У 2015 році було проведено дослідження тиліпії нільської для вивчення ролі генів *amhy* та *amhr2* у визначенні статі. З'ясовано, що надмірна експресія гена *amhy* і нокаут гена *amhr2* у XX тиліпії нільської викликають реверсію статі. На основі цих даних була висунута гіпотеза, що гени *amhy* і *amhr2* регулюють експресію ароматази, щоб модулювати визначення статі.

У риб медаки японської, незважаючи на наявність гена *dmy/dmrt1*, який є копією аутосомного гена *dmrt1* у статевій хромосомі, є також аутосомний ген *dmrt*. У медаки японської виявлено чотири гени *dmrt* – *dmrt1-4*. Серед них ген *dmrt1* є єдиним геном цього сімейства, відповідальним за диференціювання зародкових клітин у сім'яники. Однак гени *dmrt2*, *3* та *4* суттєво експресуються під час раннього ембріогенезу. Аналіз транскриптома тиліпії нільської під час диференціювання показав, що ген *dmrt1* включає диференціювання та розвиток сім'яників. На молекулярному рівні ген *dmrt1* працює антагоністично з геном *foxl2* у розвитку яєчок. Експресія *dmrt1* у клітинах Сертолі активує ген *sox9b*, що сприяє транскрипції тестикулярних генів. Крім того, експресія гена *dmrt1* у клітинах Сертолі пригнічує ген *foxl2*, а потім і ген *sup19a*.

Ген *sup19* кодує білок ароматазу, фермент, який перетворює андрогени на різні форми естрогену, жіночого статевого гормону. Аро-

матаза в ендоплазматичному ретикулумі підтримує продукцію та транспортування білків. Експресія цього гена залежить від потреби в естрогені мозку, сітківки, гіпофізу та яєчників. У променеперих риб ароматаза існує у двох ізоформах; гени *sup19a* і *sup19b* кодують два білки, P450aromA і P450aromB, відповідно. Ці білки структурно різні, але мають майже однакову каталітичну активність. Ген *sup19a*, що експресується переважно в яєчниках, локалізований у групі зчеплення 18. Навпаки, ген *sup19b*, що експресується виключно в головному мозку, локалізований у групі зчеплення 25, як показано для рибок данію. Ген *sup19a* в першу чергу бере участь у синтезі естрогенів у гранульозних клітинах фолікулів. Однак є свідчення того, що ген *sup19a* проявляється в інтерстиційних клітинах теки превітелогенних яєчників та в інтерстиційних клітинах сім'яників променеперих риб. Експресія мРНК *sup19a* та *sup19b* виявляється в основному в гонадах та головному мозку, відповідно.

Температура також має вплив на рівень ароматази. У кількох видів риб спостерігалось, що вплив підвищеної температури води під час прегонадної статевої диференціації (ранні стадії розвитку) викликав маскулінізацію риб: генотипові самки не змогли диференціюватися у повноцінних фенотипових самок. Отже, підвищена температура пригнічує ароматазу. Обробка молодих рибок данію нестероїдним інгібітором ароматази, фадрозолом, як і вплив підвищених температур призводили до придушення експресії гена *sup19a*. Оскільки променепері риби пойкилотермні, підвищені температури навколишнього середовища можуть спричинити сплеск їхньої кривої росту. З цього погляду, висока температура змушує кілька чи більше генотипних самок риб пропускати контрольні точки під час мейозу. Мейоз частіше зустрічається у самок, ніж самців. Температура може впливати на швидкість метилювання ДНК, що, у свою чергу, може змінити експресію генів.

У рибок данію експресія гена *sup19a* спостерігається до та після диференціювання гонад. Низька експресія *sup19a* призводить до зникнення ювенільних яєчників; зародкові та соматичні клітини формуються у тканині яєчка. Вплив на рибок данію більш високих концент-

рацій естрогенів або естрогенних сполук під час розвитку показує, що співвідношення статей різко змінюється у бік домінування самок, причому деякі риби мають овотести. У рибок данію нокаут гена *sup19a*, але не гена ароматази мозку *sup19b*, призводить до появи повністю чоловічих особин. Доля гонад, контрольована експресією гена *sup19a*, антагоністично контролюється генами *dmrt1* і *foxl2*. Експеримент, проведений на тилляпії, підтверджує цю гіпотезу: нокаут генів *sup19a* та *foxl2* привів до реверсії статі гонад у самок. Одночасно фолікулярні клітини, що є сусідами з дегенеруючими ооцитами, експресують *dmrt1* і 11 β -гидроксилазу. Подібним чином, під час протогінних змін у *Epinephelus marginalis* експресія гена *dmrt1* збільшувалася в міру зниження експресії гена *foxl2*.

Гостра обробка фадрозолом викликає вторинну зміну статі у дорослих самок *Astatotilapia burtoni*, вони набувають чоловічий фенотип. Однак гостра обробка фадрозолом самців *A. burtoni* викликала підвищення рівня андрогенів та зниження естрогену, а також знижувала агресивність самців. Тривала обробка фадрозолом самок нільської тилляпії з повністю диференційованими яєчниками викликає вторинну реверсію статі, за якої яєчник повністю перетворюється на фертильні сім'яники. Крім того, рівні 17 β -естрадіолу у сироватці спочатку високі і подібні з такими у самок тилляпії, які не піддавалися обробці, потім вони значно знижуються і досягають таких же рівнів, як у самців тилляпії. Після тривалої обробки фадрозолом низький рівень 11-кетотестостерону у сироватці у самок тилляпії збільшився і досяг майже такого ж рівня, що й у самців. Однак у звичайного коропа та золотої рибки обробка фадрозолом цих двох видів риб не знижує рівень естрадіолу у сироватці.

Ген *foxl2* (forkhead box L2) є одним із членів сімейства генів *fox*, який відіграє значну роль у жіночій репродуктивній системі, особливо в диференціюванні яєчників та оогенезі. Це один з основних генів, специфічних для яєчників. Його супресія приводить до пригнічення росту яєчника. Мутація цього гена призводить до аномального розвитку яєчників. Подібно до чоловічої репродуктивної системи (сім'яника), яєчник складається з трьох основних клітинних клонів:

статевих клітин, гранульозних і тека-клітин. Під час розвитку яєчників проліферуюча зародкова клітина виходить із фази мітозу і починає процес мейозу, але зупиняється в профазі I мейозу, перетворюючи зародкові клітини на ооцити. Крім того, гранульозні клітини діють як підтримуючі клітини під час розвитку яєчників, посилюючи зростання зародкових клітин. Нарешті, клітини теки та гранульози реагують на LH, виробляючи стероїдні гормони, такі як естроген.

Ген *foxl2* належить до висококонсервативного сімейства генів транскрипційних факторів. Крім того, ген *foxl2* має консервативний домен, який зв'язує ДНК з мотивом впізнавання із семи пар основ у 5'-промоторній ділянці. Послідовність ДНК гена *foxl2* у скелезуба та данію має подібні послідовності з послідовностями відкритої рамки зчитування *foxl2* ссавців, які вважаються консервативними ортологами. Гетерозиготні мутації гена *foxl2* призводять до двох синдромів: передчасної недостатності яєчників та повної втрати експресії яєчників. Білок Foxl2 відіграє важливу роль як життєво важливий фактор транскрипції під час початкового диференціювання та підтримки яєчників. Крім того, Foxl2 також відповідає за багато процесів розвитку та клітинне диференціювання.

Вивчення функції гена *foxl2* у райдужної форелі становить певний інтерес. Райдужна форель є відмінною моделлю для цього дослідження з двох причин: в еволюції геном форелі проходить спочатку тетрапоїдну, а потім диплоїдну фазу; незважаючи на те, що статеві диференціація контролюється генетичними факторами, що є механізмом XX/XU, внаслідок гормональних впливів можливий розвиток фертильних самців нео-XX або самок нео-XU. Цікаво, що у райдужної форелі є два генетично незалежні паралогічні гени *foxl2* – *foxl2a* і *foxl2b*. Експресія гена *foxl2a* у форелі подібна до експресії у ссавців. Ген *foxl2b* експресується послідовно після гена *foxl2a* і відповідає за запобігання диференціювання соматичних клітин яєчника в сім'яник. У самок нео-XU, які отримували естроген, соматичний компартмент їх яєчників експресує ген *foxl2*. Навпаки, у самців нео-XX, які отримували андроген, спостерігається пригнічення експресії гена *foxl2*.

Однак у самок ХХ, оброблених інгібітором ароматази, спостерігається експоненційне зниження експресії гена *foxl2*, як і у теляпії.

Мутація гена *foxl2* у ХХ теляпії призводить до придушення експресії гена *foxl2* і гонади розвиваються в сім'яники. Припускається, що зміна статі самки на самця у ХХ теляпії відбувається через відсутність експресії гена *foxl2*. Це зворотне явище посилюється чоловічими домінантними генами, такими як *sf1* (відомий у теляпії нільської як *ad4bp/sf-1*), *gsdf* та *dmrt1*. Навпаки, гени, які спостерігаються у самок, такі як β -*cat1*, *figla* і β -*cat2*, пригнічуються. Подібне явище також спостерігалось в інших організмів, де нокдаун гена *foxl2* у ХХ теляпії, цапа (ХХ) і подвійних мутантів даніо (*foxl2a*^{-/-} / *foxl2b*^{-/-}) викликає диференціацію у сім'яники. Зокрема, сперматозоїди, вироблені самцями зі зміненою статтю, можуть запліднити яйцеклітини, і немає жодної різниці у швидкості запліднення проти самцями дикого типу.

Ген *foxl2* впливає експресію гена *sf1*, який забезпечує розвиток гонад по чоловічому шляху. Гіпотетично, присутність гена *foxl2* пригнічуватиме експресію гена *sf1* і навпаки. З'ясовано, що ген *sf1* активується в гонадах *foxl2*^{-/-} ХХ теляпії нільської.

Фактор зародкової лінії альфа (*figla*) є транскрипційним фактором. У риб ген *figla* є маркером розвитку яєчників та початкового диференціювання ооцитів. У рибок даніо, на основі рівнів експресії *figla* на 26-й день після запліднення, особини з низьким та високим рівнями *figla* стають самцями та самками, відповідно. *Figla* не є фактором, що визначає стать, але його вища експресія у самок передбачає, що *figla* життєво важлива для руйнування кіст ооцитів, раннього фолікулогенезу та управління диференціюванням яєчників. Так само у теляпії нільської ген *figla* є специфічним для самок. Він експресується на початковій стадії первинних ооцитів. Це важливо як для фолікулогенезу, так і для оогенезу. У *Cynoglossus semilaevis* фактор *figla* кодують два гени – *figla_tv1* і *figla_tv2*. Ген *figla_tv1* експресується під час фази клітинного диференціювання яєчників і зберігається у дорослому стані та відповідає за диференціювання яєчників, а ген *figla_tv2* відповідає за сперматогенез.

У *figla*-трансгенних самців тилляпії надекспресія гена *figla* пов'язана з порушенням сперматогенезу і підвищеним рівнем *hsd3b1* та 11-кетотестостерону, але без змін *sup17a1* та *StAR* у клітинах Лейдига. Перевиробництво 11-кетотестостерону викликає дефекти сперматогенезу, оскільки підвищений рівень андрогенів може викликати раннє статеве дозрівання, зморщування яєчок і, у деяких випадках, безпліддя у чоловіків. *StAR* і *P450ssc* є двома важливими регуляторними білками стероїдогенезу в гонадах. Активація цих двох білків дозволяє припустити, що ген *figla_tv2* може грати роль сперматогенезу, оскільки він регулює синтез і метаболізм стероїдних гормонів у гонадах псевдосамців.

У медаки японської ген *gsdf* розташований на хромосомі 12. Цей ген виявлений у тих же типах клітин, що й у райдужної форелі та медаки філіппінської. Наявність гена *gsdf* за відсутності гена *dmy* призводить до маскулізації. Більше того, пригнічення експресії гена *gsdf* посилює фемінізацію риб, проте експресія гена *dmy* залишається незмінною. Після фемінізації починається процес диференціювання яєчників незалежно від експресії гена *dmy*. Було висловлено припущення, що ген *dmy* не може замінити основну функцію гена *gsdf*, яка полягає в ініціації диференціювання яєчок. Ці результати підтверджує той факт, що у гонадах особин *dmy*^{-/-} вміст мРНК гена *gsdf* зменшується у 28 разів. Оскільки експресія гена *gsdf* пов'язана з ініціацією тестикулярного диференціювання, зрозуміло, що естроген пригнічує його. Однак експресія гена *gsdf* посилюється андрогеном та високою температурою – факторами, що сприяють маскулізації. Порушення експресії *gsdf* викликає каскад змін у нижчестоящих шляхах, включаючи пригнічення гену *dmrt1* у дорослих гонадах. Отже, функцією гена *gsdf* є не лише ініціація, але й стабілізація статі риб.

З'ясовано, що делеція (*gsdf*^{-/-} XY) або дефіцит послідовності гена *gsdf* у тилляпії нільської призводить до повної реверсії статі, причому експресія гена *dmrt1* у гонадах на ранніх стадіях розвитку залишається незмінною. Навпаки, у дорослих самців медаки японської *gsdf*^{-/-} XY не відбувається зміни статі на жіночий фенотип. Однак придушення експресії гена *gsdf* у самців дикого типу медаки японської ви-

кликає у цієї риби повну фемінізацію. Таким чином, процес зміни статі у риб є багатофакторним і не залежить виключно від одного гена.

Ген *gsdf* у рибок даніо працює трохи інакше, ніж у більшості інших променеперих риб. Показано, що стать самок *gsdf*^{-/-} XX та самців XY залишається незмінною у порівнянні з диким типом. Самки *gsdf*^{-/-} XX плідні протягом короткого періоду часу. У міру старіння самок вони стають безплідними через накопичення невітелогенних фолікулів. Нокаут гена *gsdf* у самок рибок даніо знижує експресію гена вителогенина (*vtg*), який бере участь у синтезі E2. Зниження рівня цього гормону згодом погіршує вітелогенез, додатково збільшуючи кількість невітелогенних фолікулів. З іншого боку, нокаут гена *gsdf* у самців даніо не призводить до порушення плодючості риб, але у них розвиваються великі сім'яники. Великі яєчка викликають активацію кількох генів, включаючи *vasa*, *smh*, *pcna*, *tp53*, *fshr* та *casp3a*. Ген *gsdf* не розташований поряд з жодним зі зчеплених зі статтю локусів у рибок даніо. Таким чином, ген *gsdf* є видоспецифічним геном, що визначає стать.

Ген *sox9* (SRY-related HMG box 9) кодує білок Sox9, транскрипційний фактор, що належить до сімейства HMG box. У променеперих риб можна знайти два варіанти цього гена – *sox9a* та *sox9b*. Більше того, наявність та функція генів *sox9a* і *sox9b* видоспецифічні. У рибок даніо гени *sox9a* і *sox9b* по-різному експресуються у клітинах Сертолі і ооцитах, відповідно. Під час розвитку сім'яників у рибок даніо проявляється сильна експресія гена *sox9a* в біпотенційних гонадах і під час тестикулярного диференціювання вона не змінюється. У самок даніо під час ювенільного розвитку яєчника експресія гена *sox9b* виявляється на низькому рівні. Протягом оваріальної стадії експресія гена *sox9b* динамічна, він високо експресується на стадіях IV і II ооцитів і пригнічується на стадії III. У медаки японської експресується лише ген *sox9b*, як у самок XX в ооцитах, так і у самців XY в клітинах Сертолі.

Фактори довкілля

Життєво важливу роль у диференціації статі відіграє ендокринна система. Стероїдні гормони можуть викликати фенотипову зміну статі у променеперих риб. Продукування естрогену пов'язане з диференціюванням яєчників, а 11-оксигеновані андрогени беруть участь у тестикулярній диференціації. Відомо, що баланс цих двох стероїдних гормонів, а не їхня відсутність або присутність визначає статеву диференціацію гонад. У чавичі інгібування синтезу естрогену за допомогою специфічних ферментів, таких як інгібітор ароматази, викликає фенотипову маскулінізацію генетично самок риб. Естроген необхідний диференціації жіночої статі, тоді як його відсутність призводить до диференціації чоловічої статі.

Хоча розвиток сім'яників може вимагати, а може і не вимагати андрогенів, вони повинні підтримувати чоловічий фенотип, тому що за їх відсутності накопичується E2, що зводить до мінімуму експресію гена *dmrt1*, який відповідає за тестикулярне диференціювання. Тому чоловіча стать променеперих риб зберігається за рахунок репресії гена *sup19a*. У відсутність естрогену це призводить до часткової або повної функціональної маскулінізації, що вказує на те, що збереження яєчників вимагає постійного вироблення естрогену. Отже, естроген є важливим гормоном для диференціювання гонад у яєчники для розвитку і збереження цієї статевої форми. З'ясовано, що крім статевих гормонів, за маскулінізацію променеперих риб відповідає кортизол. Це обумовлене тим, що ключовий фермент синтезу кортизолу також відповідає за синтез 11-оксигенованого андрогена, який сприяє диференціюванню сім'яників. З іншого боку, кортизол збільшує експресію гена *sup19a*. Однак, ген *sup19a* зазнає епігенетичного інгібування при підвищенні температури, що призводить до маскулінізації самок променеперих риб.

Фактори довкілля, такі як температура, рН та соціальні взаємодії можуть впливати не лише на детермінацію, але й диференціацію статі у променеперих риб. Коливання температури довкілля впливає на біохімічні шляхи, що призводить до змін у диференціації статі. Як правило, у термочутливих променеперих риб підвищення температури

спричиняє розвиток сім'яників, що призводить до збільшення чисельності самців. З іншого боку, встановлення низької температури води спричиняє розвиток яєчників. Це явище зустрічається у кількох видів роду *Apistogramma* і *Dicentrarchus labrax*, різновиду морського окуня. Однак температурні зрушення мають вирішальне значення тільки в початковому процесі статевої диференціації. Термочутливість променеперих риб може бути спадковою рисою. *Poeciliopsis lucida*, що походить з Мексики, являє собою живородну променеперу рибу з генетичним поліморфізмом щодо визначення статі і схильну до впливу навколишнього середовища, в даному випадку температури. В експерименті, проведеному з використанням двох штамів *P. lucida*, а саме M61-31 і S68-4, штам M61-31 продукував більшість нащадків чоловічої статі (169 із 187 нащадків) при 30 °С; при 24 °С співвідношення зміщалося у бік потомства жіночої статі (250 із 395 нащадків). Однак у іншого штаму, S68-4, співвідношення самців і самок було близько до 1 : 1 та не залежало від температури.

У деяких видів променеперих риб підвищення або зниження температури не впливає на стать потомства, наприклад у *Cyprinodon variegatus*, *Coregonus hoyi*, райдужної форелі, медаки японської і коропа звичайного. Це вказує, що деякі променепері риби мають сильну генетичну детермінацію статі, але можуть бути малочутливими або нечутливими до навколишнього середовища. З іншого боку, такі види, як морський окунь, чутливі до певного фактора навколишнього середовища, наприклад, зміни температури або рН. Нарешті, такі види, як даніо, чутливі до багатьох чинників довкілля: підвищення температури, щільності популяції та гіпоксія можуть викликати маскулінізацію рибок даніо. Відомо, що у променеперих риб, у яких у визначенні статі провідну роль відіграє температура, ключовою речовиною є кортизол, який відіграє значну роль в активації чоловічого шляху розвитку.

Вплив температури на статеву диференціацію на молекулярному рівні залишається незрозумілим. Однак, з'ясовано, що ген *sup19a*, який визначає стать, бере участь у механізмі температурозалежного визначення статі. Ген *sup19a* забезпечує диференціювання яєчників

Odontesthes bonariensis при 17 °С. Інкубація личинок *Odontesthes bonariensis* при 29 °С пригнічувала експресію гена *sup19a* і приводила до маскулінізації риб. Крім того, верхній регулятор гена ароматази, ген *foxl2*, також регулюється температурою під час статевої диференціації у *Paralichthys olivaceus*. У цього виду експресія генів *foxl2* та рецептора FSH (*fshr*) пригнічувалася при високих температурах під час статевого диференціювання. Передача сигналів Foxl2 і FSH важлива для регулювання транскрипції гена *sup19a* під час статевої диференціації видів з температурозалежним механізмом визначення статі. З'ясовано, що висока температура (29 °С) індукує експресію гена *amhy*, сигналу маскулінізації, але пригнічує шлях диференціювання яєчників, підтримуваний геном *sup19a*. Самці *Odontesthes hatcheri* рідко розмножуються при низьких температурах. Їхня частка серед особин XY збільшується з підвищенням температури. Це показує, що експресія маскулінізуючого гена *amhy* залежить від температури.

Іншим фактором довкілля, що впливає на диференціацію статі є рН води. Кисла вода викликає маскулінізацію у *Poecilia melanogaster*, *Poecilia sphenops* та *Pelvicachromis pulcher*. Місцевий бразильський вид *Colossoma macropomum* мешкає у широкому діапазоні рН як у природному середовищі (4-7,2), так і в аквакультурі (4,0-8,0). Недиференційованих риб цього виду обробляли кислою (6,7) або лужною (8,2) водою протягом 45 днів, які є лабільним періодом до статевої диференціації; контрольна (рН=7,5) і лужна група давали співвідношення статей 1:1, тоді як група з рН=6,7 призводила до зміщення у бік самців (1,4:1). Вважають, що зсув може бути результатом іонного стресу.

Pelvicachromis pulcher – цихліда невеликого розміру, що мешкає в Західній Африці. *P. pulcher* чутливий до рН води під час розвитку. Кислі умови створюють популяцію з переважанням самців у порівнянні з нейтральною рН. Встановлено, що рН не лише грає роль статевої диференціації у *P. pulcher*, але й змінює фенотипову експресію у самців і самок, модифікуючи їх схильність до агресії.

У дослідженні, проведеному на райдужній форелі, встановлено, що низький рН (5,6-6,0) призводить до підвищеного рівня кортизолу в плазмі, стресової реакції на низький рН. Крім того, високий рівень секретованого тестостерону у воді може вказувати на зсув репродуктивної ендокринології райдужної форелі. З огляду на те, що підвищені температури викликають стрес, який приводить до підвищення рівня кортизолу, можна припустити, що низька рН також викликає стрес у променеперих риб, що призводить до підвищення рівня кортизолу, внаслідок чого в популяції відбувається зсув у бік чоловічої статі.

Соціальний фактор в основному регулює зміну статі у відповідь на щільність популяції та співвідношення самців та самок у даний період. Точний механізм цього ефекту складний і остаточно не вивчений. У *Thalassoma bifasciatum* можливі два різні шляхи розвитку самців: вони можуть природно дозрівати як самці (первинні самці), або дозрівати як самки, а потім зазнавати зміни статі (вторинні самці). Висока щільність популяції зазвичай породжує первинних самців. У *Cichlasoma citrinellum* соціальним фактором, що впливає на статеву диференціацію, є розмір молоді, при цьому відносно більші риби дозрівають як самці.

Дослідження двох ліній даніо показали, що в популяціях з високою щільністю (100 риб/1,5 л) переважали самці, ймовірно, через гіпоксичні умови. Під час гіпоксії придушення генів, відповідальних за синтез статевих гормонів, і сплеск 11-кетотестостерону і E21 у самок даніо призводять до зсуву популяції на користь самців. Крім того, ембріони даніо, вирощені в умовах гіпоксії, демонструють порушення міграції первинних зародкових клітин, зміну концентрації статевих гормонів, збільшення передачі сигналів гіпоксично-індукованого фактора-1 (HIF-1), що також призводить до популяції з переважанням самців. Враховуючи, що гіпоксія є фактором, що викликає стрес, вона може спровокувати вироблення кортизолу, який запобігає розвитку яєчників та сприяє маскулінізації. Кортизол також може інгібувати експресію ароматази, згодом підвищуючи швидкість апоптозу в зача-

тках гонад або підвищуючи синтез 11-кетотестостерону і сприяючи маскулізації риб.

Гіпоксія та щільність популяції взаємопов'язані як соціальні фактори. Теоретично, у міру збільшення щільності популяції, збільшується споживання кисню рибами, що призводить до зменшення кількості кисню у воді. Отже, гіпоксичний стан, який викликає у риб стрес, може спричинити підвищення рівня кортизолу, що веде до зміни у них рівня стероїдів. Дослідження амурського осетра (*Acipenser schrenckii*) показало високий рівень кортизолу внаслідок гіпоксії. Можливо, негативний зворотний зв'язок кортизолу маскулізує риб під час статевої диференціації: кортизол інгібує експресію ароматази, яка потім активує шлях розвитку чоловічих статевих залоз.

Роль мозку при диференціації статі залишається маловивченою. У рибок даніо нокдаун або пригнічення гормонів гіпофіза, LH та FSH, їх експресія та секреція суттєво не впливають на розвиток гонад. Нокдаун і придушення гонадотропних гормонів лише затримує розвиток статевих залоз, сім'яників та яєчників. Проте добре відомо, що LH та FSH регулюють експресію стероїдних гормонів, включаючи T та E2. Крім того, обидва гормони, T і E2, необхідні для диференціювання яєчок і яєчників, відповідно. Крім того, T і E2 мають позитивний і негативний зворотний зв'язок з мозком, таким чином регулюючи сексуальну функцію та поведінку.

У дослідженні, проведеному на самках *Epinephelus coioides* рівні мРНК GnIH в гіпоталамусі коливаються на різних стадіях розвитку гонад. Експресія мРНК GnIH низька під час первинних зародкових клітин, але збільшується під час раннього диференціювання яєчників з первинними ооцитами та знижується під час вітелогенної стадії. Подібним чином рівні експресії мРНК GnIHR у гіпофізі варіюють протягом розвитку яєчників. Встановлено, що пептид GnIH відіграє роль у синтезі та секреції T та E2. Крім того, GnIH регулює рівні мРНК GnRH, LH β і FSH β , а у *Epinephelus coioides* обробка GnIH знижує експресію мРНК GnRH і LH β . Крім GnIH, кісспептин також бере участь у статевої диференціації кількох видів риб, у тому числі скумбрії японської (*Scomber japonicus*) та *Amphiprion melanopus*. Подібно

до GnIH, експресія мРНК кісспептину коливається в залежності від розвитку гонад, а обробка кісспептином збільшує експресію GnRH, LH β і FSH β . Отже, GnIH та кісспептин можуть відігравати роль у диференціації статі.

Незважаючи на те, що немає досліджень, які показують, що LH та FSH відповідальні за регуляцію генів диференціації статі, постулюється, що і FSH, і LH грають значну роль у регуляції диференціації статі.

Практичне використання механізмів, які впливають на визначення статі

Використання гормонів в аквакультурі сприяє формуванню одностатевої культури заради збільшення швидкості зростання за короткий час. Для отримання одностатевих риб використовують або безпосередню обробку риб гормонами, які забезпечують розвиток бажаної статі, або опосередкований метод, при якому батьківських риб обробляють гормонами, внаслідок чого потомство стає неосамцем, неосамкою або суперсамцем, які виробляють одностатевих мальків. Для отримання одностатевих риб використовують широкий спектр природного E₂, синтетичного естрогену та синтетичного андрогену (17 α -метилтестостерон). Після обробки зазначені стероїди легко метаболізуються в організмі.

Методи гормональної обробки для зміни статі включають ін'єкції, силіконові імпланти, занурення або додавання гормонів в корм (метод годування). З комерційної точки зору найбільш рентабельними для використання в аквакультурі є методи занурення та введення гормонів у раціон. Однак у порівнянні з методом занурення, який вимагає знання типу гормону, температури води та тривалості впливу, метод годування більш розумний і дає рибі оптимальну дозу для індукції та повної зміни статі.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Як здійснюється детермінація статі у риб?
2. Поясніть роль генів і статевих хромосом у детермінації статі.
3. Які методи визначення статевих хромосом у риб вам відомі?
4. Які механізми забезпечують статеву диференціацію у риб?
5. Вкажіть на особливості успадковування ознак, зчеплених зі статтю, у риб.

ЗАДАЧІ

1. Як показав Ямомото, стать у медаки можна перевизначити, додаючи до корму мальків статеві гормони. Яке розщеплення слід очікувати від схрещування нормальної самки і вторинного самця (самки, перевизначеної у самця) за умови гомогаметності жіночої статі.

В експерименті по схрещуванню вторинних самок (самці, перевизначені у самок) з нормальними самцями отримали наступний розподіл по статі: 94 самки і 315 самців. Як можна пояснити отримані дані.

2. Білі самці акваріумної рибки медаки схрещені із червоними самками. У F_1 самки та самці мали червоне забарвлення. У F_2 з'явилися 117 червоних самців та самок та 43 білих самця. У зворотному схрещуванні білих самок з червоними самцями F_1 отримано 197 білих самців і 130 червоних самок. Як успадковується ознака? Які генотипи батьків? Яке розщеплення очікується у F_2 зворотного схрещування серед 200 нащадків?

3. У риби *Aplocheilus* самки гомогаметні, а самці гетерогаметні. Y-хромосома так само, як і X-хромосома містить алелі генів. У нормі риби мають коричневе забарвлення, що визначається алелем B ; блакитне забарвлення – b . Y-хромосома завжди містить алель B і ніколи – b . Отже самці ніколи не бувають блакитними. Якими будуть F_1 і F_2 від схрещування блакитної самки з коричневим гомозиготним самцем. У чому відмінність цього наслідування від аутосомного та зчепленого зі статтю?

ЗРАЗКИ ТЕСТІВ

1. Якого типу визначення статі не існує?

- 1) Прогамний
- 2) Сингамний
- 3) Епігамний
- 4) Апогамний

2. У райдужної форелі ген *gsdf* розташований на:

- 1) X-хромосомі
- 2) Y-хромосомі
- 3) хромосомі 2
- 4) хромосомі 6

3. У медаки японської ген *gsdf* розташований на:

- 1) X-хромосомі
- 2) Y-хромосомі
- 3) хромосомі 2
- 4) хромосомі 12

4. Експресія гена *gsdf* посилюється:

- 1) андрогеном
- 2) естрогеном
- 3) високою температурою
- 4) низькою температурою

5. Що означає – ознаки зчеплені зі статтю?

- 1) гени, що детермінують ознаки, знаходяться у статевих хромосомах і успадковуються з певною статтю
- 2) гени, що детермінують ознаки, знаходяться у статевих хромосомах і їхній фенотиповий прояв залежить від комбінування статевих хромосом
- 3) визначаються матір'ю
- 4) гени, що детермінують ознаки, знаходяться лише в аутосомах

6. У променеперих риб статева диференціація залежить від:

- 1) генів,
- 2) гормонів
- 3) зовнішніх факторів
- 4) усього вище названого

7. Факторами навколишнього середовища, які впливають на статеву диференціацію, є:

- 1) температура
- 2) рН
- 3) соціальний статус
- 4) світловий режим

8. Факторами навколишнього середовища, які впливають на статеву диференціацію, є:

- 1) щільність популяції,
- 2) концентрація кисню
- 3) кормова база
- 4) гормональний статус

9. У популяції переважає чоловіча стать, якщо:

- 1) $\text{pH} < 7$
- 2) $\text{pH} = 7$
- 3) $\text{pH} > 7$

10. У популяції переважає жіноча стать, якщо:

- 1) $\text{pH} < 7$
- 2) $\text{pH} = 7$
- 3) $\text{pH} > 7$

11. Ген *сур19а* локалізований:

- 1) у групі зчеплення 1
- 2) у групі зчеплення 8
- 3) у групі зчеплення 12
- 4) у групі зчеплення 18

12. Ген *сур19b* локалізований:

- 1) у групі зчеплення 6
- 2) у групі зчеплення 15
- 3) у групі зчеплення 18
- 4) у групі зчеплення 25

13. Гетерозиготні мутації гена *foxl2* призводять до:

- 1) передчасної недостатності яєчників
- 2) повної втрати експресії яєчників.
- 3) руйнації сім'яників
- 4) недорозвитку сім'яників

14. Підвищення або зниження температури не впливає на стать потомства у:

- 1) *Cyprinodon variegatus*,
- 2) *Coregonus hoyi*,
- 3) морського окуня
- 4) *Poeciliopsis lucida*

15. Підвищення або зниження температури не впливає на стать потомства у:

- 1) райдужної форелі,
- 2) медаки японської
- 3) кількох видів роду *Apistogramma*,
- 4) *Dicentrarchus labrax*

16. До багатьох чинників довкілля (підвищення температури, щільності популяції, гіпоксії) чутливі:

- 1) даніо
- 2) морський окунь
- 3) райдужна форель
- 4) короп звичайний

Евристичне завдання

Відомо, що в життєвому циклі приблизно в 2% всіх видів риб зареєстрований гермафродитизм. Послідовні види гермафродитів (таких, що змінюють стать протягом життя) виявлені в 27 з 448 родин, які відносяться до 7 рядів. Багато з них знайшли свою нішу на коралових рифах. У цих риб редиференціювання статі гонад відбувається при зміні статі у дорослому стані. Зокрема, для губанів *Halichoeres trimaculatus* і *Thalassoma duperrey* характерна протогінна зміна статі, для риби-клоуна *Amphiprion clarkii* – протандрична, для окінавської бичкової риби *Trimma okinawae* – двоспрямована зміна статі.

Спробуйте пояснити механізми цих процесів. Додаткову інформацію можна знайти у публікаціях:

1. Godwin J.R., Thomas P. Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *Gen Comp Endocrinol.* 1993) 91) P. 144–157
2. Kobayashi Y., Nagahama Y., Nakamura M. Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sex Dev.* 2012) 7 (1-3). P. 115–125.

Відповіді на тести:

1: 4	9: 1
2: 4	10: 2, 3
3: 4	11: 4
4: 1, 3	12: 4
5: 2	13: 1, 2
6: 4	14: 1, 2
7: 1, 2, 3	15: 1, 2
8: 1,2	16: 1

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Базалій В. В., Бех В. В., Пилипенко Ю. В., Лісний В. А. Генетика риб. Херсон: Олді-Плюс, 2020. 306 с.
2. Fish Diseases and Medicine / Eds. S.A. Smith. CRC Press, 2019. 416 p. ISBN 9781498727860
3. Fish Genetics and Aquaculture Biotechnology / Eds. T. J. Pandian, C. A. Strüssmann, M. P. Marian. CRC Press, 2005. 170 p.
4. Gomelsky B. Fish Genetics. Theory and Practice. VDM Verlag Dr. Müller. 2011. 190 p.
5. Kobayashi Y., Nagahama Y., Nakamura M. Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sex Dev.* 2012. 7 (1-3). P. 115-125.
6. Nelson J. S., Grande T. C., Wilson M. V. H. Fishes of the World. Fifth Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 708 p.
7. Rajendiran P., Jaafar F., Kar S., Sudhakumari C., Senthilkumaran B., Parhar I. S. Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. *Biology (Basel)*. 2021. 10(10). P. 973-977.

Навчальне видання

ГЕНЕТИКА РИБ

Ч. 1. Детермінація та диференціація статі у риб

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до самостійної роботи
з курсу «Генетика риб»
для студентів
другого (магістерського) рівня вищої освіти

Електронне практичне видання

Укладач

Січняк Олександр Львович

В авторській редакції

Затвердж. авт. 25.03.2024. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 0,8 МБ. Зам. № 2773.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua