

УДК 591.392

ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО АНДРОГЕНЕЗА У ОСЕТРОВЫХ РЫБ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

© 2017 г. Д. А. Балашов^а *, Е. В. Виноградов^а, К. В. Ковалев^а,
А. Е. Барминцева^б, А. В. Рекубратский^а, А. С. Грунина^с

^аВсероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства
141821 пос. Рыбное, Московская обл.

^бВсероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии
107140 Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17

^сИнститут биологии развития им. Н.К. Колыцова РАН 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26
*E-mail: balashoff@gmail.com

Поступила в редакцию 29.01.2017 г.
Окончательный вариант получен 03.04.2017 г.

Изложены результаты исследований по получению гаплоидного андрогенеза у сибирского осетра и стерляди с помощью УФ-облучения яйцеклеток. Во время облучения яйцеклетки, помещенные в раствор Рингера, вращали вокруг УФ-лампы. Об эффективности генетической инактивации яйцеклеток судили по следующим показателям: проявлению эффекта Гертвига, по доле эмбрионов, у которых на завершающих стадиях развития проявлялся гаплоидный синдром, по остановке эмбрионального развития у гибридов сибирский осетр × белуга и по отсутствию у эмбрионов материнских аллелей микросателлитных локусов. По характеру кривой доза-эффект можно заключить, что при УФ-облучении яйцеклеток сибирского осетра полная их генетическая инактивация достигается при экспозиции 120 с, а у стерляди – 90 или 105 с. Результаты указывают на принципиальную возможность инактивации ядер яйцеклеток с помощью УФ-облучения и использования таких яйцеклеток для получения андрогенетического потомства у осетровых рыб.

Ключевые слова: гаплоидный андрогенез, УФ-облучение, сибирский осетр, стерлядь, эффект Гертвига, гаплоидный синдром, анализ микросателлитной ДНК

DOI: 10.7868/S0475145017050020

ВВЕДЕНИЕ

Индукцированный андрогенез позволяет получать потомство, развивающееся только за счет отцовской наследственности, без участия женского хромосомного комплекса. Для получения диплоидного андрогенеза необходимо инактивировать ядро яйцеклетки и вызвать удвоение мужских хромосом с помощью блокирования первого деления дробления у андрогенетических зародышей либо за счет слияния ядер спермиев при полиспермном оплодотворении.

Индукцированный андрогенез используется для решения таких задач, как получение высокоинбредных линий и клонов, регуляции пола, изучения взаимоотношений ядра и цитоплазмы и других. В последнее время метод привлекает особое внимание в связи с возможностью использования его для восстановления редких и исчезающих видов из генетического материала их спермиев (Veprintsev, Rott, 1979; Corley-Smith, Brandhorst, 1999). В этой связи, одним из важных объектов для применения андрогенеза являются осетровые рыбы,

многие виды и популяции которых близки к исчезновению (Birstein et al., 1997).

Ранее было показано (Грунина, Нейфах, 1991), что андрогенетические диплоидные потомства осетровых рыб, получаемые за счет блокирования первого деления дробления у андрогенетических зародышей, нежизнеспособны из-за повышенной чувствительности этих рыб к возникающей при этом полной гомозиготности. В этой связи применительно к осетровым рыбам был разработан метод диспермного андрогенеза (Grunina et al., 1995), позволяющий получать гетерозиготные андрогенетические потомства с обычным уровнем генетической изменчивости. С использованием этого метода получены жизнеспособные андрогенетические потомства у нескольких видов осетровых рыб (Grunina et al., 1995; Recoubratsky et al., 1996; Грунина, Рекубратский, 2005), в том числе с использованием криоконсервированной спермы (Grunina et al., 2006). Также с помощью диспермного андрогенеза получены жизнеспособные андрогенетические ядерно-цитоплазматиче-

ческие гибриды (Грунина, Рекубрятский, 2005; Grunina et al., 2009). Таким образом, метод уже получил достаточное развитие, однако использование его усложняется тем, что до настоящего времени для генетической инактивации яйцеклеток применялось исключительно ионизирующее излучение (рентгеновское или γ -облучение) (Грунина, Рекубрятский, 2005). Источники такого излучения дороги и требуют использования специально оборудованных помещений. Кроме того, эти источники обычно удалены от осетровых хозяйств, что затрудняет проведение работ по андрогенезу.

Аналогичная проблема, возникшая при получении андрогенеза у видов рыб, продуцирующих некрупную прозрачную икру, была успешно решена за счет использования коротковолнового ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовые лампы просты в обращении и могут быть размещены в любом помещении.

Андрогенез с использованием УФ-облучения был успешно получен у вьюна (Arai et al., 1992), карпа (Bongers et al., 1994), нильской тилляпии (Myers et al., 1995), клариевого и мешкожаберного сомов (Bongers et al., 1995; Christopher et al., 2012), суматранского барбуса (Kirankumar, Pandian, 2003) ельца (Kucharczyk et al., 2008), обыкновенной тернеции (David, Marimuthu, 2014) и некоторых других видов. Поскольку ультрафиолет обладает низкой проникающей способностью, для достижения равномерного облучения и полной инактивации материнских хромосом яйцеклетки либо перемешивали во время облучения, либо размещали УФ-лампы сверху и снизу чашек с икринками, распределенными в один слой.

Первая попытка получения андрогенеза у осетровых рыб с помощью УФ-облучения была предпринята на белом осетре *Acipenser transmontanus* (Kowtal, 1987). После длительного УФ-облучения яиц и применения к эмбрионам теплового шока было получено несколько морфологически нормальных личинок, но доказательств их андрогенетического происхождения не приводится. Продолжения эта работа не получила. Примечательно, однако, что в первом опыте УФ-инактивации яйцеклеток рыб был использован самый трудный для этой цели объект – осетровые. Яйца осетровых значительно крупнее, чем у большинства других рыб, к тому же они совершенно непрозрачны.

В настоящей работе изложены результаты опытов по получению гаплоидного андрогенеза у сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и стерляди (*A. ruthenus*), в которых использовали новый способ инактивации ядер яйцеклеток с помощью оригинального метода облучения ультрафиолетом.



Рис. 1. Установка для УФ-облучения яйцеклеток осетровых рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Зрелые яйца и сперму сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и стерляди (*A. ruthenus*) получали на Конаковском заводе по осетроводству и в охлажденном состоянии доставляли во ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства (пос. Рыбное Московской обл.), где проводились опыты. Сперму белуги (*Huso huso*) брали из материалов Криобанка ВНИИПРХ, где она хранится в криоконсервированном состоянии.

УФ-облучение яйцеклеток. Ультрафиолетовую лампу Osram HNS S 9W G23, дающую коротковолновой ультрафиолет с длиной волны 254 нм, помещали вертикально внутрь 1000 мл химического стакана (рис. 1), установленного на магнитной мешалке. Стакан заполняли раствором Рингера, модифицированным для осетровых рыб (Гончаров, 1978). Порцию неоплодотворенных яйцеклеток (примерно 300 шт.) переносили в стакан и включали магнитную мешалку, регулируя скорость вращения так, чтобы все яйцеклетки вращались вокруг лампы. Затем включали лампу. Дозу УФ-облучения яйцеклеток выражали временем экспозиции.

Осеменение. Облученные яйцеклетки переносили в сухой 250 мл стакан. Один мл спермы смешивали с 50 мл отстоянной водопроводной воды и выливали в икру. Смесь икры со спермой помещали в стакане гусиным пером в течение 3 мин, не-

обходимых для максимально полного осеменения. Затем жидкость сливали, а икринки переносили для дальнейшей инкубации в чашки Петри (по 50–75 шт. на чашку), заполненные отстоянной водопроводной водой. Для исключения фотореактивации УФ-повреждений ДНК яйцеклеток осеменение проводили в затемненном помещении.

Криоконсервированную сперму белуги перед осеменением размораживали. Пробирки (2.5 мл эппендорф) с замороженной спермой переносили из жидкого азота в емкость с водой, подогретой до 40°C, и оттаивали в течение 1 мин. Затем пробирки вскрывали и извлекали содержимое в сухой стакан. Поскольку сперму перед замораживанием разбавляли криопротектором в соотношении 1 : 1, а также с учетом возможного снижения оплодотворяющей способности размороженной спермы, для осеменения порции икры брали содержимое трех пробирок, сперму активировали 50 мл воды и выливали в икру. По истечении 3 мин осемененные яйцеклетки отмывали от криопротектора путем трехкратной смены воды в стакане. Затем яйцеклетки переносили в чашки Петри для инкубации.

Инкубация эмбрионов. Затемнение осемененных яйцеклеток сохраняли до начала дробления. Известно, что УФ-повреждения ДНК после первой пострадиационной репликации переходят в нефотореактивируемое состояние (Rupert, 1975).

Эмбрионов инкубировали в чашках Петри при температуре 16°C и ежедневной двукратной смене воды. На стадии четырех бластомеров (5 стадия эмбрионального развития осетров; здесь и далее стадии эмбрионального развития приводятся по Гинзбург, Детлаф, 1969) проводили учет оплодотворенных яйцеклеток, также учитывали количество погибших эмбрионов на стадиях поздней гаструлы (17 стадия), обособления хвоста (26 стадия) и незадолго до начала вылупления, когда хвост эмбриона касается головы (32 стадия).

Вылупившихся предличинок переносили из чашек Петри в небольшие емкости со свежей водой.

Выделение и анализ микросателлитной ДНК. Выделение и последующую очистку ДНК из хвостовых отделов эмбрионов и плавников производителей проводили на адсорбционных колонках PALL 5051 (AcroPrep™ 96 1 ml filter plate with 1.0 µm Glass Fibermedia, natural housing) в соответствии с протоколом Канадского центра по ДНК-стрихкодированию (Ivanova, 2006).

Для анализа использовали набор из шести микросателлитных локусов (Afug41, Afug51, An20, AoxD161, AoxD165, Afug135), ранее опубликованных для других видов осетровых (Zane, 2002; Henderson, King, 2002; Welsh, 2003). Данные локусы были выбраны по принципу высокой воспроизводимости амплификации, наибольшего полиморфизма, соответствия равновесию Харди–

Вайнберга и отсутствию нуль-аллелей (Барминцева, Мюге, 2013).

Реакции амплификации проводили в конечном объеме 15 мкл 70 мМ Трис-НСl (рН 8.6); 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1.8 мМ MgCl₂; по 200 мкМ каждого dNTP; 1 пкМ праймера, модифицированного на 5'-конце флуоресцентным красителем FAM, HEX или TAMRA; 4 пкМ обратного (не меченного) праймера; 50–100 нг ДНК; 0.8 единиц *Taq*-полимеразы (Силекс, Москва) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94°C – 1 мин; 8 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 58°C в первом цикле – 25 с и в каждом последующем цикле температура отжига снижалась на 0.5°C, синтез ДНК – 65°C – 40 с; 25 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 54°C, синтез ДНК – 65°C – 40 с; досинтез ДНК при 65°C – 10 мин. Полученную ПЦР смесь разбавляли в 3 раза водой (milliQ), затем по 1 мкл разбавленной реакции переносили в 12 мкл формамида HiDi с добавленным молекулярным стандартом для определения размера амплифицируемых фрагментов ДНК. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза “ABI 3130 Genetic analyzer”, определение длин аллелей осуществляли с применением программного обеспечения GeneMarker (Version 1.2).

Схема опытов. Проведено четыре опыта по индукции андрогенетического развития у осетровых.

Опыт 1. Смесь яйцеклеток от трех самок сибирского осетра разделили на порции и подвергли УФ-облучению в дозах 0 (контрольная группа), 30, 60, 90, 120, 150, 240 и 480 с. Для осеменения использовали смесь спермы от трех самцов сибирского осетра.

Опыт 2. Яйцеклетки от одной самки сибирского осетра разделили на порции и подвергли УФ-облучению в дозах 0 (контрольная группа), 90, 120, и 150 с. Затем яйцеклетки из каждой группы разделили на две части. Одну часть осеменили спермой одного самца сибирского осетра, а вторую – спермой одного самца белуги.

Опыт 3. Яйцеклетки самки сибирского осетра, участвовавшей в опыте 2, облучили в дозах 90 и 120 с и оплодотворили спермой самца сибирского осетра, участвовавшего в опыте 2. Эмбрионов проинкубировали в чашках Петри и перед вылуплением зафиксировали в этаноле. У самки и самца, участвовавших в опыте 3, зафиксировали в этаноле фрагменты хвостового плавника. Фиксации были выполнены для последующего молекулярно-генетического анализа.

Опыт 4. Смесь яйцеклеток от трех самок стерляди разделили на порции и подвергли УФ-облучению в дозах 0 (контрольная группа), 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 и 165 с. Для осеменения использовали сперму от трех самцов стерляди.

Таблица 1. Выживаемость эмбрионов сибирского осетра на разных стадиях развития в зависимости от дозы УФ-облучения неоплодотворенных яйцеклеток

Доза УФ, с	Число яиц, штук	Количество живых эмбрионов							Нормальных предличинки	
		стадия 5		стадия 17		стадия 32			штук	% от ст. 5
		штук	%	штук	% от ст. 5	штук	% от ст. 5	% гаплоидов		
0	528	310	58.7	303	97.7	254	81.9	0.0	238	76.8
30	1096	267	24.4	110	41.2	56	21.0	0.0	1	0.4
60	954	83	8.7	62	74.7	5	6.0	83.3	4	4.8
90	1029	171	16.6	78	45.6	22	12.9	81.8	2	1.2
120	764	125	16.4	82	65.6	26	20.8	92.3	0	0.0
150	912	165	18.1	39	23.6	3	1.8	100	0	0.0
180	1162	194	16.7	61	31.4	4	2.1	100	0	0.0
240	466	23	4.9	8	34.8	0	0.0	—	0	0.0
480	621	0	0.0	0	0.0	0	0.0	—	0	0.0

Критерии генетической инактивации яйцеклеток.

Об эффективности УФ-инактивации яйцеклеток судили по следующим показателям:

- по кривым выживаемости доза-эффект на разных стадиях развития эмбрионов (проявление эффекта Гертвига);

- по доле эмбрионов, у которых на завершающих стадиях развития проявлялся гаплоидный синдром. Главными признаками гаплоидного синдрома у эмбрионов осетровых являются нитевидное сердце, оводнение перикарда, укороченный хвостовой отдел и искривление осевых структур (Рекубратский и др., 1998) (см. рис. 3в, 3г);

- по остановке эмбрионального развития у гибридов сибирский осетр × белуга;

- по отсутствию у эмбрионов материнских аллелей микросателлитных локусов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Опыт 1. В опыте 1 (табл. 1, рис. 2) наблюдали дозозависимое снижение процента оплодотворения яйцеклеток (стадия 5, четыре blastomeres). При максимальной УФ-экспозиции, 480 с, яйцеклетки утратили способность к оплодотворению. Сходная картина имела место и на гастрале. На завершающих эмбриональных стадиях развития проявился эффект Гертвига: выживаемость зародышей, достигнув нуля при облучении в дозе 30 с, затем постепенно стала расти, достигла максимума при дозе 120 с и снова снизилась до нуля (рис. 2). Количество вылупившихся морфологически нормальных предличинки быстро снижаясь, достигло минимума в дозе 90 с и далее оставалось нулевым. Доля эмбрионов с гаплоидным синдромом уже при дозе 60 с увеличилась до 83%, а в дозе 150 с достигла максимума (табл. 1).

Опыт 2. В опыте 2 одну часть облученных яйцеклеток сибирского осетра оплодотворили спермой сибирского осетра, а другую – спермой белуги (табл. 2). Икра оказалась невысокого качества, что определило небольшой выход морфологически нормальных предличинки в контрольных группах (30% у сибирского осетра и 16% у гибридов осетр × белуга).

Эмбрионы сибирского осетра из УФ-облученных групп развивались до вылупления, почти все они имели признаки гаплоидного синдрома. Морфологически нормальных особей среди немногих освобожденных от оболочек предличинки не было.

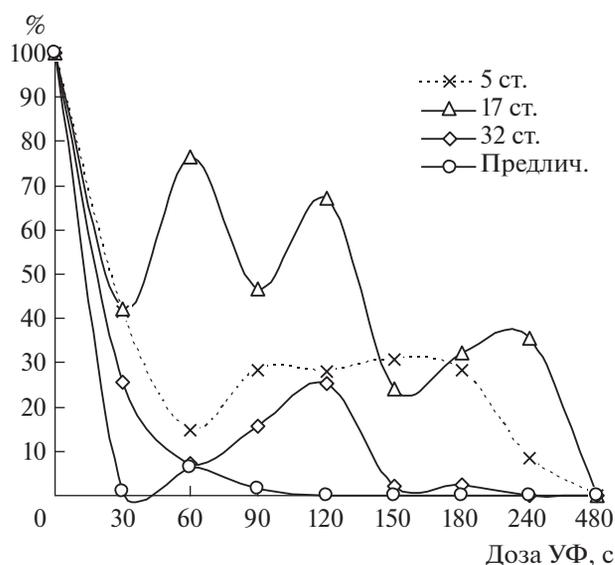


Рис. 2. Выживаемость эмбрионов сибирского осетра на разных стадиях развития в зависимости от дозы облучения неоплодотворенных яйцеклеток (в процентах от выживаемости в контрольной группе, доза УФ – 0 с).

Таблица 2. Выживаемость эмбрионов сибирского осетра и гибридов сибирский осетр × белуга в зависимости от дозы УФ-облучения неоплодотворенных яйцеклеток

Доза УФ, с	Число яиц, штук	Количество живых эмбрионов							Нормальных предличинок	
		стадия 5		стадия 17		стадия 32			штук	% от ст. 5
		штук	%	штук	% от ст. 5	штук	% от ст. 5	% гаплоидов		
Сибирский осетр × сибирский осетр										
0	821	615	74.9	374	45.6	—	—	0.0	187	30.4
90	904	627	69.4	172	27.4	45	7.2	81.6	0	0.0
120	736	421	57.2	137	32.5	37	8.8	87.9	0	0.0
150	511	117	22.9	46	39.3	4	3.4	100.0	0	0.0
Сибирский осетр × белуга										
0	956	521	54.5	385	73.9	—	—	—	85	16.3
90	780	204	26.1	80	39.2	0	—	—	0	0
120	823	101	12.3	42	41.6	0	—	—	0	0
150	363	27	7.4	12	44.4	0	—	—	0	0

Все гибридные эмбрионы (сибирский осетр × белуга) из всех трех УФ-облученных групп остановились в развитии на стадии поздней бластулы, к гаструляции ни один из них не приступил (табл. 2, рис. 3а, 3б). Остановившиеся в развитии эмбрионы оставались живыми в течение 2–3 дней, а затем погибли.

Опыт 3. Перед выделением ДНК эмбрионы из обеих УФ-облученных групп (УФ-облучение яйцеклеток в дозах 90 и 120 с) были объединены в одну общую выборку. Генотипы эмбрионов сравнивали с генотипами производителей и определяли, содержат ли потомки аллели обоих родителей или только одного из них.

На примере, представленном на рис. 4 видно, что у эмбрионов из облученной группы отсутствуют материнские аллели 106, 122 и 134 локуса AoxD161. Оба эмбриона несут только гаплоидный набор отцовских аллелей — 102, 110 и 126. На примере, представленном на рис. 5, видно, что у одного из потомков (D03) диплоидный набор локуса Afug135 представлен двумя отцовскими и двумя материнскими аллелями. Другой потомок (E03) имеет гаплоидный набор, представленный только отцовскими аллелями.

Большая часть эмбрионов из облученных групп (23 штуки, 71.9%) имела только отцовские аллели исследованных локусов, однако у 9 эмбрионов (28.1%) были найдены материнские аллели. Среди этих девяти эмбрионов семь имели как материнские, так и отцовские аллели, а два — только материнские.

Опыт 4. Опыт был проведен на стерляди, его результаты представлены в табл. 3 и на рис. 6. В отличие от опыта 1 с сибирским осетром в данном опыте нарастание дозы УФ-облучения яйцеклеток не сопровождалось ни существенным сниже-

нием процента оплодотворения, ни дозозависимой гибелью зародышей на ранних стадиях развития (до начала нейруляции). При наименьшей использованной дозе (5 с) выживаемость ранних зародышей превысила выживаемость контрольных примерно на 10%. На эмбриональной стадии 32 проявился эффект Гертвига: кривая выживаемости, достигнув минимума при дозе 30 с, начинает расти и достигает максимальных значений в дозах 90 и 105 с (рис. 6). Количество нормальных предличинок снизилось до нуля в дозе 60 с, а доля эмбрионов с гаплоидным синдромом приблизилась к 100% в дозе 90 с.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты по УФ-облучению неоплодотворенных яйцеклеток сибирского осетра и стерляди убедительно продемонстрировали возможность генетической инактивации яйцеклеток осетровых рыб с помощью коротковолнового ультрафиолета и способность таких яйцеклеток к андрогенетическому развитию.

В нашей работе важным фактором, способствующим успешной инактивации ядер яйцеклеток осетровых рыб явилось использование для облучения устройства новой конструкции (рис. 1).

В опытах получено несколько независимых доказательств УФ-инактивации яйцеклеток.

Эффект Гертвига. Эффект Гертвига (Hertwig, 1911) заключается в особом поведении кривой, описывающей выживаемость зародышей на завершающих стадиях эмбриогенеза в зависимости от дозы облучения яйцеклеток или спермиев: с увеличением дозы выживаемость вначале резко снижается до минимальных значений, а затем возрастает с последующим выходом на плато в случае облуче-

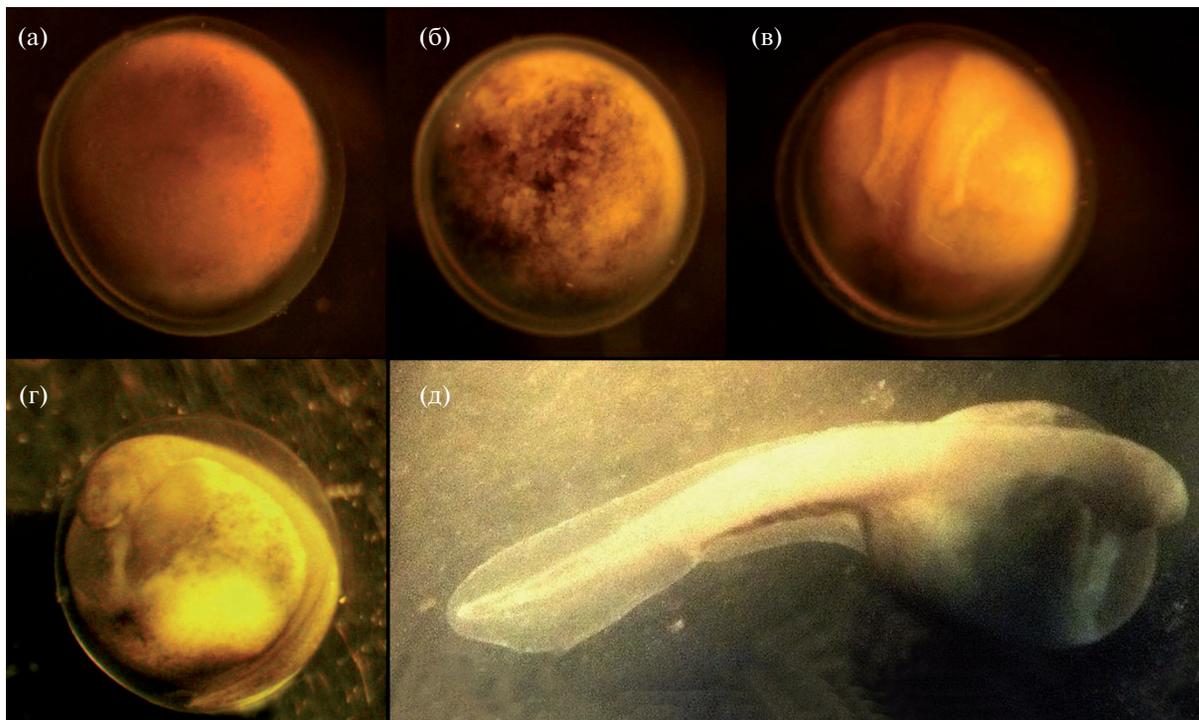


Рис. 3. Эмбриональное развитие сибирского осетра (в, г, д) и гибрида сибирский осетр × белуга (а, б) после УФ облучения неоплодотворенных яйцеклеток. Остановка в развитии гибридного эмбриона: а – бластула, анимальный полюс; б – бластула, вегетативный полюс; в – эмбрион сибирского осетра того же возраста, продолжающий развитие; г, д – гаплоидный синдром (нитевидное сердце и оводнение перикарда).

ния спермиев и повторно снижается при облучении яйцеклеток. Такой характер кривой доза-эффект объясняется последовательным течением нескольких процессов.

Первое снижение выживаемости эмбрионов связано с быстрым накоплением в облученных хромосомах летальных повреждений, последующее увеличение выживаемости обусловлено постепенной элиминацией наиболее поврежденных хромосом. Максимум выживаемости эмбрионов, развивающихся после облучения яйцеклеток или спермиев нарастающими дозами радиации соответствует полной инактивации их хромосомного набора. Вторичное снижение выживаемости эмбрионов при облучении яйцеклеток связано с повреждением высокими дозами цитоплазматических структур (Grunina, Neyfakh, 1997).

В наших опытах по УФ-облучению яиц сибирского осетра и стерляди также был продемонстрирован эффект Гертвига (табл. 1 и 3, рис. 2 и 6, соответственно), который проявился, однако, довольно поздно, уже на стадиях развития, предшествовавших вылуплению, и был менее выражен по сравнению с эффектом УФ-облучения спермиев у осетровых (Рекубратский и др., 2003) или рентгеновским облучением яйцеклеток осетровых (Грунина, Нейфак, 1991). На основании пове-

дения кривой доза-эффект в наших опытах можно заключить, что при УФ-облучении яйцеклеток сибирского осетра полная их генетическая инактивация была достигнута в дозе 120 с, а у стерляди – в дозе 90 или 105 с.

В работах на других рыбах четкий эффект Гертвига был зафиксирован лишь однажды, при получении андрогенеза после УФ-облучения яйцеклеток у суматранского барбуса (Kirankumar, Pandian, 2003). В большинстве остальных работ эффект Гертвига при УФ-облучении яйцеклеток обнаружить не удалось (Christopher et al., 2012). По-видимому, это связано с тем, что в силу слабой проникающей способности ультрафиолета генетическая инактивация в разных яйцеклетках из облучаемой порции достигается неодновременно, и в достаточно большом диапазоне доз в выборке присутствуют как диплоидные (анеуплоидные), так и гаплоидные эмбрионы. При этом смертность эмбрионов при субоптимальных дозах не опускается до нуля и может практически не меняться. Такая картина продемонстрирована в нескольких работах, выполненных на разных видах рыб (Myers et al., 1995; Abdel-Nakim et al., 2000; Karayücel, Karayücel, 2001; Kirankumar, Pandian, 2003; Christopher et al., 2012; David, Marimuthu, 2014).

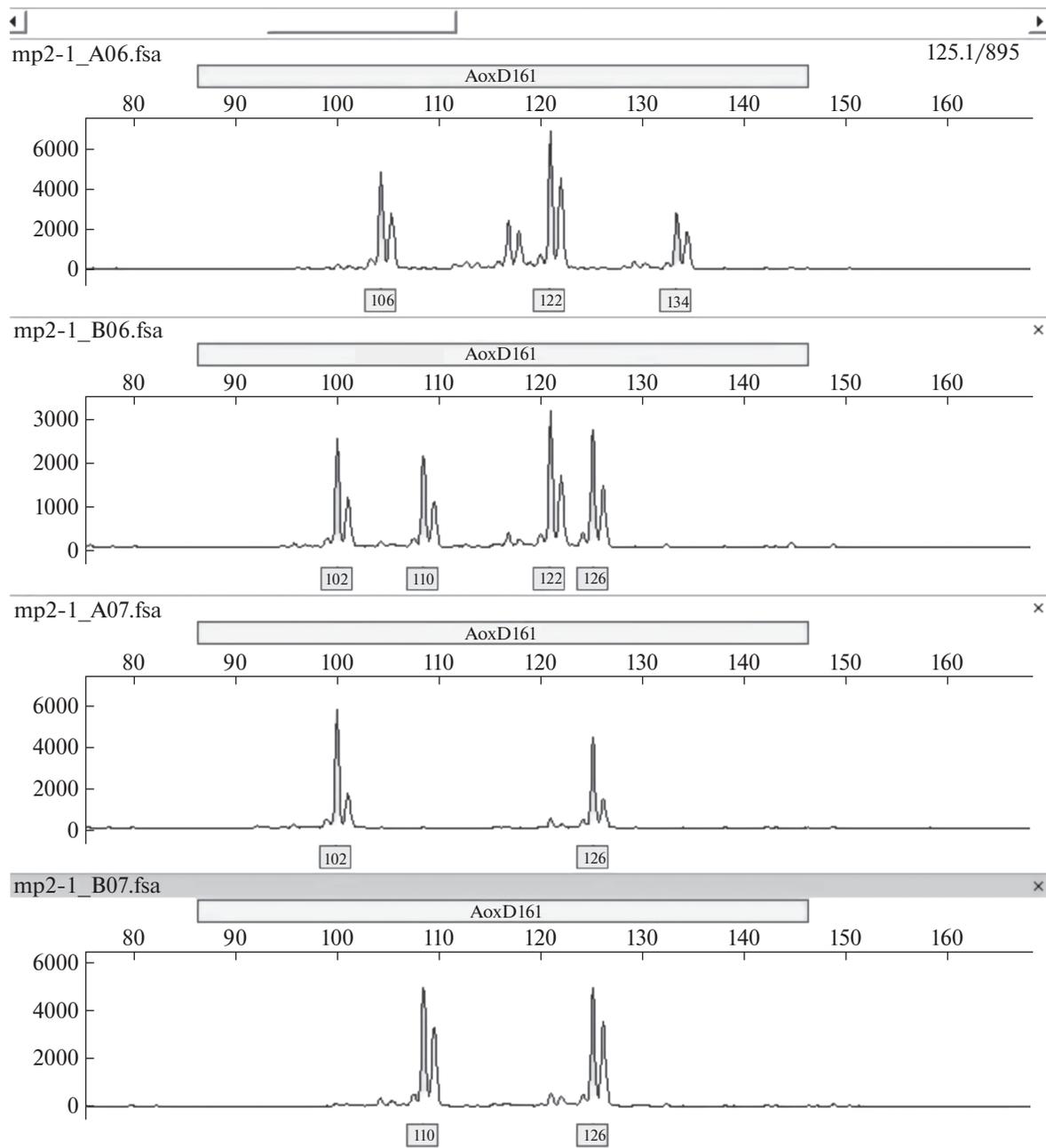


Рис. 4. Пример амплификации ДНК локуса AoxD161 у производителей сибирского осетра (A06 – самка, B06 – самец) и их потомков (A07 и B7).

Гаплоидный синдром. Наш опыт по получению у осетровых гиногенеза с помощью УФ-облучения (Рекубратский и др., 2003) и андрогенеза с использованием рентгеновского облучения (Рекубратский и др., 1998; Грунина, Рекубратский, 2005) показывает, что характерные повреждения эмбрионов, свойственные гаплоидному статусу (оводнение перикарда, нитевидное сердце и др.), у некоторых особей могут не проявляться или проявляться менее выражено, чем у основной

массы гаплоидов. Причем у многохромосомных видов, в том числе у сибирского осетра, слабая выраженность гаплоидного синдрома встречается относительно чаще, чем у малохромосомных. Однако у уродливых диплоидных и анеуплоидных эмбрионов нарушения развития имеют другой характер. Таким образом, рассматривая характер эмбриональных уродств, можно достаточно четко идентифицировать гаплоидов.

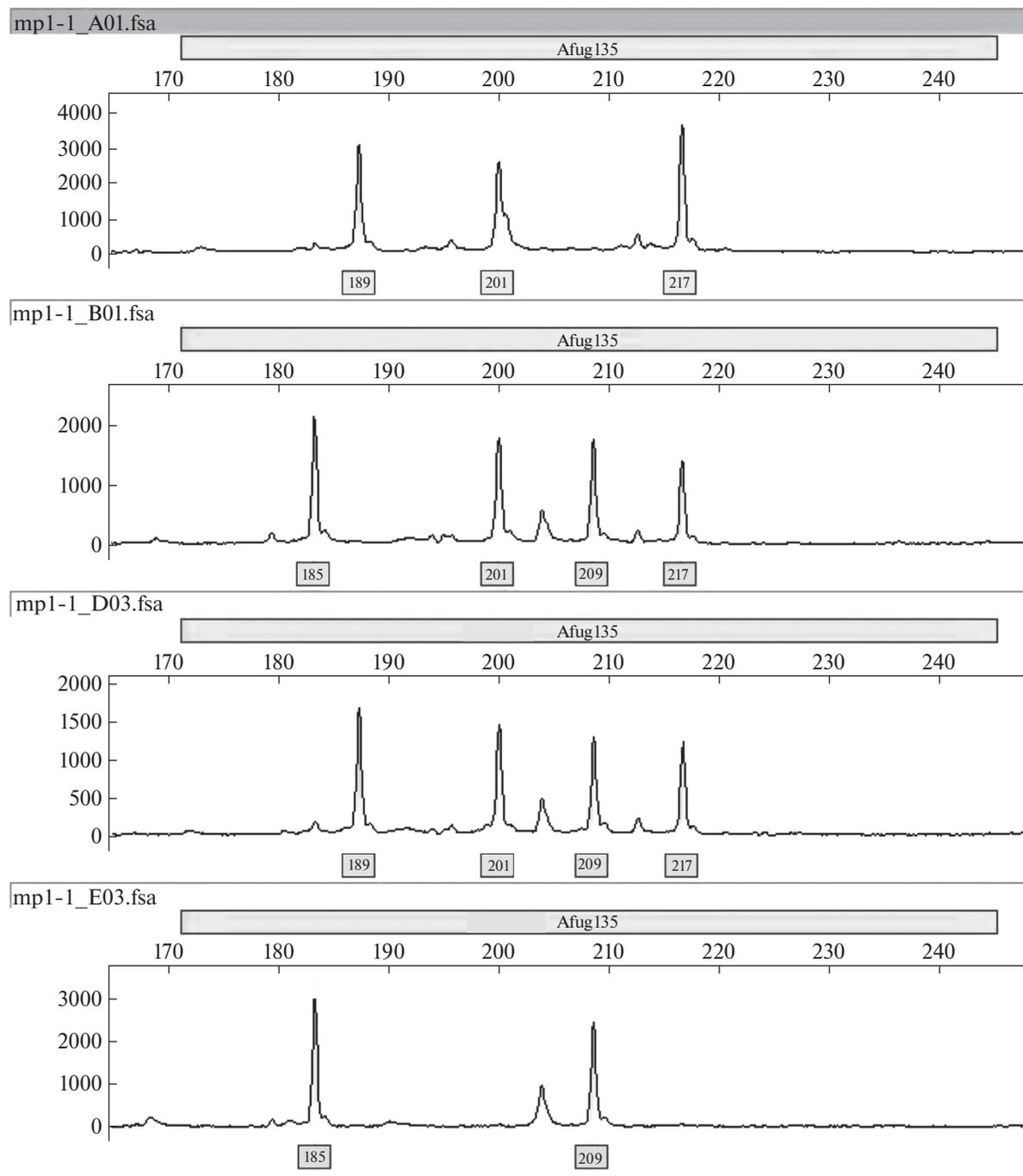


Рис. 5. Пример амплификации ДНК локуса Afug135 у производителей сибирского осетра (A01 – самка, B01 – самец) и их потомков (D03 и E03).

В наших опытах по получению андрогенетических зародышей из УФ-облученной икры доля эмбрионов с гаплоидным синдромом нарастала постепенно, достигая максимума в дозах 150 и 105 с соответственно у сибирского осетра и стерляди. Таким образом, и в наших опытах при облучении в субоптимальных дозах в выборке присутствовали как гаплоидные, так и анеуплоидные

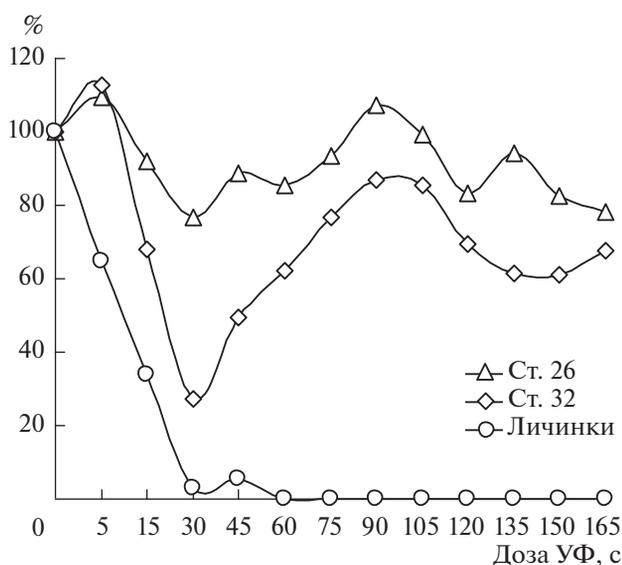
(или диплоидные) эмбрионы, то есть, имеет место такая же ситуация, что и в других работах на других видах рыб (см. выше).

При облучении в дозах, определенных по эффекту Гертвига как полностью инактивирующие (120 и 90 с) обнаружено по 1–2 эмбриона без проявлений гаплоидного синдрома. Однако, вряд ли

Таблица 3. Выживаемость эмбрионов стерляди на разных стадиях развития в зависимости от дозы УФ-облучения неоплодотворенных яйцеклеток

Доза УФ, с	Число яиц, штук	Количество живых эмбрионов									Нормальных предличинок	
		стадия 5		стадия 17		стадия 26		стадия 32			штук	% от ст. 5
		штук	%	штук	% от ст. 5	штук	% от ст. 5	штук	% от ст. 5	% гаплоидов		
0	488	225	46.1	205	91.1	182	80.9	174	77.3	0.0	150	66.7
5	438	243	55.5	237	97.5	215	88.5	212	87.2	0.0	105	43.2
15	466	249	53.4	223	89.6	185	74.3	131	52.6	0.0	56	22.5
30	335	100	29.9	92	92.0	62	62.0	21	21.0	85.7	2	2.0
45	364	110	30.2	105	95.5	88	80.0	42	38.2	89.7	4	3.6
60	402	52	12.9	43	82.7	36	69.2	25	48.1	94.1	0	0.0
75	289	37	12.8	33	89.2	28	75.7	22	59.5	95.0	0	0.0
90	393	107	27.2	103	96.3	93	86.9	72	67.3	98.0	0	0.0
105	298	56	18.8	53	94.6	45	80.4	37	66.1	100.0	0	0.0
120	377	138	36.6	125	90.6	93	67.4	74	53.6	100.0	0	0.0
135	293	59	20.1	57	96.6	45	76.3	28	47.5	100.0	0	0.0
150	380	57	15.0	50	87.7	38	66.7	27	47.4	100.0	0	0.0
165	310	84	27.1	68	81.0	53	63.1	44	52.4	100.0	0	0.0

на этом основании следует в дальнейших работах по получению диплоидного андрогенеза у осетровых увеличивать инактивирующую дозу, поскольку даже небольшое ее увеличение в этом диапазоне приводит к значительному уменьшению выживаемости.

**Рис. 6.** Выживаемость эмбрионов стерляди на разных стадиях развития в зависимости от дозы облучения неоплодотворенных яйцеклеток (в процентах от выживаемости в контрольной группе, доза УФ — 0 с).

Остановка эмбрионального развития у андрогенетических гибридов сибирский осетр × белуга. Андрогенетические гибриды, полученные в данном исследовании в результате оплодотворения облученных яйцеклеток сибирского осетра спермой белуги (опыт 2), остановились в развитии на стадии поздней бластулы, к гастрюляции ни один из них не приступил (табл. 2, рис. 3а, 3б).

Ранее мы наблюдали остановку эмбрионального развития у гаплоидных и диплоидных андрогенетических гибридов между русским осетром и севрюгой а также у гибридов между сибирским осетром и стерлядью (Рекубратский и др., 1998). Материнские виды в обеих этих парах имеют по 240 хромосом (русский и сибирский осетры), а отцовские — по 120 хромосом (севрюга и стерлядь). Очевидно, что гаплоидный набор малохромосомного вида не в состоянии обеспечить гастрюляцию андрогенетического эмбриона, развивающегося из яйца многохромосомного вида.

В данном опыте андрогенетические гибриды также были образованы видами, имеющими 240 и 120 хромосом (сибирский осетр и белуга, соответственно). Следовательно, остановка эмбрионального развития у этих гибридов указывает на генетическую инактивацию яйцеклеток и андрогенетический характер развития.

Остановка в развитии всех эмбрионов наблюдалась также и при использовании дозы УФ-облучения 90 с (табл. 2), при которой, как это следует из выше приведенных материалов (кривая выживаемости эмбрионов стерляди на стадии 32), выживаемость эмбрионов на стадии 32 была 66,1%.

мости эмбрионов, рис. 2 и количество гаплоидов, табл. 1), генетическая инактивация еще не полная. Очевидно, остановка развития происходит не только у гаплоидов, но может наблюдаться и у анеуплоидов, возникающих при использовании субоптимальных доз. Сам по себе гибридный критерий весьма удобен, он позволяет быстро определить подходящие для облучения дозы, однако он должен быть дополнен другими критериями генетической инактивации яйцеклеток.

Анализ микросателлитной ДНК. Для проверки генетической инактивации яйцеклеток сибирского осетра в результате УФ-облучения был проведен анализ микросателлитной ДНК по шести локусам. Анализ показал отсутствие материнских аллелей у большинства (23 штуки, 71.9%) проанализированных эмбрионов из облученных групп, что указывает на успешную в этих случаях индукцию андрогенетического развития. Однако у 9 эмбрионов (28.1%) были найдены материнские аллели. Среди этих девяти эмбрионов семь имели как материнские, так и отцовские аллели, а два — только материнские. Эмбрионы, обнаружившие только материнские аллели, очевидно, развивались гиногенетически, причем из не полностью инактивированных яйцеклеток. О случаях спонтанной инактивации мужского хромосомного набора и индукции гиногенеза у рыб хорошо известно (Гомельский, Рекубратский, 1990).

Случаи неполной инактивации скорее всего относятся к меньшей дозе облучения (90 с). Так или иначе, при продолжении работ по андрогенезу у осетровых необходимо будет оптимизировать и стандартизировать условия УФ-облучения, а также выполнять его с использованием откалиброванных ламп, прошедших дозиметрию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1093–1105.
- Гинзбург А.С., Детлаф Т.А. Развитие осетровых рыб. Созревание яиц, оплодотворение и эмбриогенез. М.: Наука, 1969. 134 с.
- Гомельский Б.И., Рекубратский А.В. О возможности спонтанного андро- и гиногенеза у рыб // Вопросы ихтиологии. 1990. Т. 30. № 4. С. 698–700.
- Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов // Вопросы раннего онтогенеза рыб. Киев: Наук. Думка, 1978. С. 77–78.
- Грунина А.С., Нейфах А.А. Индукция диплоидного андрогенеза у сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt // Онтогенез. 1991. Т. 22. № 1. С. 53–56.
- Грунина А.С., Рекубратский А.В. Индуцированный андрогенез у рыб: получение жизнеспособных ядерно-цитоплазматических гибридов // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 4. С. 254–264.
- Рекубратский А.В., Грунина А.С., Мюге Н.С., Нейфах А.А. Получение андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов у осетровых рыб // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 4. С. 394–400.
- Рекубратский А.В., Грунина А.С., Барминцев В.А. и др. Мейотический гиногенез у севрюги, русского осетра и стерляди // Онтогенез. 2003. Т. 32. № 2. С. 121–131.
- Abdel-Hakim N.F., Soltan M.A., Bakeer M.N. Induction of diploid androgenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) // Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish. 2000. V. 4. № 4. P. 337–349.
- Arai K., Masaoka T., Suzuki R. Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs // Nippon Suisan Gakkaishi. 1992. V. 58. № 7. P. 1197–1201.
- Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J.R. The threatened status of acipenseriform fishes: a summary // Sturgeon Biodiversity and Conservation / Eds. Birstein, V.J. et al. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 427–444.
- Bongers A.B.J., Veld E.P.C., Abo H.K. et al. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks // Aquaculture. 1994. V. 122. № 2. P. 119–132.
- Bongers A.B.J., Nguenga D., Eding E.H., Richter C.J.J. Androgenesis in the African catfish, *Clarias gariepinus* // Aquat. Liv. Res. 1995. V. 8. P. 329–332.
- Christopher J.G., Murugesan A.G., Sukumaran N. Optimization of UV treatment to induce haploid androgenesis in the stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* // Int. Aquatic. Res. 2012. V. 4. № 1. P. 1–8.
- Corley-Smith G.E., Brandhorst B.P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? // Mol. Reprod. Develop. 1999. V. 53. P. 363–367.
- David C.J., Marimuthu G. Successful induction of intraspecific androgenesis in widow tetra, *Gymnocorymbus ternetzi* (Boulenger 1895) using UV irradiation // Asian Fisheries Science. 2014. V. 27. P. 117–126.
- Grunina A.S., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis // Physiol. Gen. Biol. Rev. 1997. V. 12. P. 73–103.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis in sturgeons // Sturgeon Quart. 1995. V. 3. № 3. P. 6–7.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Tsvetkova L.I., Barmintsev V.A. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm // Int. J. Refrigeration. 2006. V. 29. № 3. P. 379–386.
- Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Barmintsev V.A. et al. Dispermic androgenesis as a method for recovery of endangered sturgeon species // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons / Ed. Carmona R. Springer Sciences, 2009. P. 187–204.
- Hertwig O. Die radium Krankheit tierischer keim zellen // Arch. Mikrosk. Anat. 1911. V. 77. S. 1–97.
- Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 437–439.
- Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 998–1002.

- Karayücel I., Karayücel S. Optimisation of UV treatment duration to induce haploid androgenesis in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2003. V. 27. P. 401–407.
- Kirankumar S., Pandian T.J. Production of androgenetic tiger herb, *Puntius tetrazona* // Aquaculture. 2003. V. 228. P. 37–51.
- Kowal G.V. Preliminary experiments in induction of polyploidy, gynogenesis, and androgenesis in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson // Proc. World Symp. Selection, Hybridization Genet. Engineering Aquaculture / Ed. Tiews K. Berlin: Heene-mann, 1987. V. 2. P. 317–324.
- Kucharczyk D., Kucharczyk D., Targońska K. et al. Genetic inactivation of dace, *Leuciscus leuciscus* (L.), gametes using UV irradiation // Archives of Polish Fisheries. 2008. V. 16. № 4. P. 437–446.
- Myers J.M., Penman D.J., Basavaraju Y. et al. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 205–210.
- Recoubratsky A.V., Grunina A.S., Minin A.A. et al. Dispermic androgenesis in *Acipenser stellatus* // Sturgeon Quart. 1996. V. 4. № 4. P. 12–14.
- Rupert C. Enzymatic photoreactivation, overview // Molecular Mechanisms for Repair of DNA. New-York, London: Plenum-Press, 1975. Pt A. P. 73–124.
- Veprintsev B.N., Rott N.N. Conserving genetic resources of animal species // Nature. 1979. V. 280. P. 633–634.
- Welsh A.B., Blumberg M., May B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecol. Notes. 2003. V. 3. P. 47–55.
- Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 586–588.

Induced Androgenesis in Acipenserids May Be Obtained by Ultraviolet Radiation

D. A. Balashov^{1,*}, E. V. Vinogradov¹, K. V. Kovalev¹, A. E. Barmintseva²,
A. V. Recoubratsky¹, and A. S. Grunina³

¹Federal Research Institute of Freshwater Fisheries (VNIIPRKh), Rybnoe, Moscow oblast, 141821 Russia

²Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia

³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: balashoff@gmail.com

Received January 29, 2017; in final form, April 3, 2017

The results are presented on haploid androgenesis in Siberian sturgeon and starlet induced by UV irradiation of ovicells. During irradiation, the cells in Ringer solution were rotated around a UV lamp. The efficiency of genetic inactivation of ovicells was estimated by the following parameters: manifestation of Hertwig effect, the fraction of embryos demonstrating haploid syndrome at final developmental stages, by arrest of embryonic development in hybrids Siberian sturgeon × great sturgeon, and by absence of maternal alleles of microsatellite loci in embryos. The dose-effect curve suggests that, during UV irradiation of ovicells of Siberian sturgeon, the complete genetic inactivation is attained at exposition of 120 s, while that in starlet is 90 or 105 s. The results show a principal possibility of inactivation of ovicells by UV irradiation and use of such cells for producing androgenetic progeny of acipenserids.

Keywords: haploid androgenesis, UV irradiation, Siberian sturgeon, starlet, Hertwig effect, haploid syndrome, analysis of microsatellite DNA