

УДК 639
ББК 47.2
Н72

Н72 Новейшие генетические технологии для аква-культуры: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29 – 31 января 2020 г). – М.: Издательство «Перо», 2020. – 350 с. – Мб. [Электронное издание]. – Систем. требования: процессор x86 с тактовой частотой 500 МГц и выше; 512 Мб ОЗУ; Windows XP/7/8; видеокарта SVGA 1280x1024 High Color (32 bit). – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-00171-087-5

В сборнике представлены материалы Международной научно-практической конференции с международным участием «Новейшие генетические технологии для аквакультуры» проходившей в г. Москва, МВЦ «Крокус Экспо», 29 – 31 января 2020 г в рамках выставки «Agros 2020».

УДК 639
ББК 47.2

ISBN 978-5-00171-087-5

© Авторы статей, 2020

ПРОЦЕДУРА УФ-ОБЛУЧЕНИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНДРОГЕНЕЗА

Балашов Д.А., Виноградов Е.В., Ковалев К.В., Рекубратский Н.В.,
Рекубратский А.В.

Филиал по пресноводному рыбному хозяйству «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)
balashoff@gmail.com

THE PROCEDURE OF UV-IRRADIATION OF STURGEON EGGS IN PRODUCTION OF ANDROGENESIS

Balashov D., Vinogradov E., Kovalev K., Recoubratsky N., Recoubratsky A.

Резюме. *Описан оригинальный способ УФ облучения яйцеклеток сибирского и русского осетров для их генетической инактивации с целью получения гаплоидного андрогенеза. Найдены оптимальные дозы облучения, полностью инактивирующие хромосомный набор яйцеклеток. Показано, что введение в состав среды облучения антиоксидантов ослабляет повреждающее действие УФ на цитоплазматические структуры яйцеклеток и тем самым повышает выживаемость гаплоидных андрогенетических эмбрионов.*

Ключевые слова: андрогенез, УФ-облучение, яйцеклетки, антиоксиданты, глутатион, супероксиддисмутаза, осетровые рыбы.

Summary. *An original method for genetic inactivation of Siberian and Russian sturgeon eggs with UV-irradiation has been described in the paper. The method is used to induce haploid androgenesis in sturgeons. UV-dosages that cause total genetic inactivation of sturgeon eggs was found. Antioxidants (glutathione and superoxide dismutase) being added to the irradiation medium were shown to diminish cytoplasmic damaging and increase survival rate of the androgenetic haploid embryos.*

Key words: androgenesis, UV-irradiation, eggs, antioxidants, glutathione, superoxide dismutase, Sturgeons

Введение

Андрогенетическое развитие происходит под контролем исключительно отцовского генетического аппарата без вовлечения материнской ядерной наследственности. Чтобы индуцировать диплоидный андрогенез, необходимо элиминировать хромосомный набор в яйцеклетках, а затем вызвать диплоидизацию мужского набора хромосом.

Андрогенез может применяться для изучения взаимоотношений ядра и цитоплазмы в развитии, для получения высокоинбредных линий и клонов,

регуляции пола и для решения других проблем. Важнейшая сфера применения андрогенеза связана с возможностью восстановления генотипов редких и исчезающих видов рыб из криоконсервированной спермы [Veprintsev, Rott, 1979]. Поэтому особое значение приобретает получение андрогенетического потомства у осетровых рыб, многие виды и популяции которых близки к исчезновению и занесены в Красную Книгу. Ранее было получено жизнеспособное андрогенетическое потомство у нескольких видов осетровых (Grunina et al, 2005; Recoubratsky et al., 2006). Для генетической инактивации яйцеклеток применялось исключительно ионизирующее облучение (рентгеновское или γ -облучение) (Грунина, Рекубратский, 2005). Однако источники такого излучения дороги, небезопасны и весьма труднодоступны. Практическое использование андрогенеза в программах по восстановлению популяций осетровых без решения этой проблемы фактически невозможно.

Для многих костистых рыб проблема инактивации яйцеклеток была решена с помощью коротковолнового ультрафиолетового облучения. УФ-андрогенез был успешно получен у вьюна [Arai et al. 1992], карпа [Bongers et al. 1994], нильской тилапии [Myers et al. 1995], некоторых сомовых [Bongers et al. 1995; Christopher et al., 2012], суматранского барбуса [Kirankumar, Pandian, 2003], ельца [Kucharczyk D. et al., 2008], тернеции [David, Marimutu, 2014] и некоторых других видов рыб. Ультрафиолет обладает низкой проникающей способностью, поэтому для достижения полной инактивации материнских хромосом мелкие прозрачные яйцеклетки костистых рыб или перемешивали в процессе облучения в чашках Петри, или облучали с двух сторон, помещая чашку с яйцеклетками между двумя источниками УФ-света. Эта техника позволяла ультрафиолету проникать к анимальному полюсу яйцеклетки и разрушать их хромосомы.

До настоящего времени нет опубликованных работ, в которых УФ-облучение привело бы к получению жизнеспособного потомства у осетровых рыб. Это в первую очередь связано с тем, что большие и непрозрачные яйцеклетки осетров представляются специфически устойчивыми к УФ радиации. В нашей предыдущей работе описан оригинальный способ облучения яйцеклеток, который позволил получить полную генетическую инактивацию яйцеклеток сибирского осетра и стерляди [Балашов и др., 2017]. Однако в этой работе не определены точные параметры облучения яйцеклеток, приводящего к инактивации материнских хромосом.

В настоящем исследовании приведены уточненные параметры ультрафиолетового облучения яйцеклеток для получения гаплоидного андрогенеза у сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и русского осетра (*A. guldenstadtii*). Кроме того, приведены данные исследований различных сред облучения, показывающие, что жизнеспособность УФ-облученных яйцеклеток можно повысить благодаря введению в среду облучения антиоксидантов.

Материалы и методы

Половые продукты (яйцеклетки и сперму) сибирского осетра получали на Конаковском заводе по осетроводству и в охлажденном состоянии доставляли во ВНИИПРХ.

УФ-облучение яйцеклеток. Ультрафиолетовую лампу Osram HNS S 9W G23, дающую коротковолновой ультрафиолет с длиной волны 254 нм, замыкали в водонепроницаемый кожух из кварцевого стекла, готовую конструкцию помещали вертикально внутрь химического стакана объемом 1000 мл, установленного на магнитной мешалке. Стакан заполняли раствором Рингера, модифицированным для осетровых рыб (RMS) [Гончаров, 1978]. Порцию неоплодотворенных яйцеклеток (250 – 300 шт.) переносили в стакан и включали магнитную мешалку, скорость вращения магнита устанавливали на 400 об/мин. В результате все яйцеклетки вращались вокруг УФ-лампы. Затем включали лампу (рис 1). Для стабильной работы лампы ее подключали в сеть через стабилизатор напряжения.

В опытах, в которых определяли эффективные дозы облучения, облучатель помещали в стакан из кварцевого стекла (рис.1б), снаружи по центру стакана располагался датчик РМА 2122 УФ-радиометра РМА 2100 (Solar Light USA). Дозу УФ-облучения яйцеклеток выражали в мкДж/см², а также временем экспозиции (в секундах).

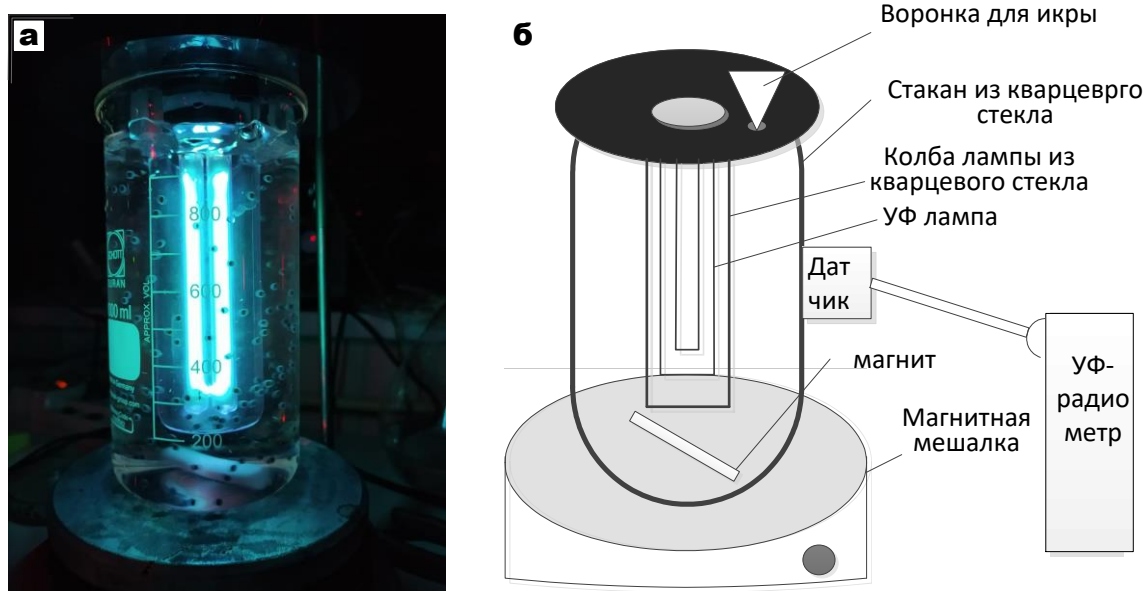


Рисунок 1 - Установка для облучения яйцеклеток осетровых рыб
А - УФ-облучение; б – схема установки для определения дозы с помощью УФ-дозиметра

Влияние антиоксидантов. В работе испытывали защитный эффект антиоксидантов. Было проведено 5 облучений, время экспозиции каждого

составило 105 сек. Все облучения проводили по стандартной методике, различия касались только среды, в которой облучали яйцеклетки. Приготовили 5 растворов, основой всех растворов служил RMS, он же являлся контролем, опытные варианты содержали антиоксиданты, восстановленный глутатион (glut) и супероксиддисмутазу (SOD). Состав растворов представлен в таблице 1.

Осеменение. Облученные яйцеклетки переносили в сухой 250 мл стакан. Один мл спермы смешивали с 50 мл отстоянной водопроводной воды и выливали в икру. 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 используя красный свет от фотографического фонаря.

Стадии эмбрионального развития определяли в соответствии с руководством Гинзбург и Детлаф [Гинзбург и Детлаф, 1969].

Таблица 1 – Состав экспериментальных сред, в которых проводили УФ-облучение яйцеклеток сибирского осетра

Раствор	Содержание глутатиона (мг/л)	Содержание SOD (мг/л)
RMS	-	-
RMS+glut	150	-
	300	-
RMS+glut+SOD	150	3
	300	3

Результаты

Определение доз УФ, вызывающих генетическую инактивацию яйцеклеток. Об эффективности УФ-инактивации яйцеклеток судили по кривым выживаемости доза-эффект на разных стадиях развития эмбрионов (проявление эффекта Гертвига), а также 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, искривление осевых структур [Рекубратский и др., 1998] (рис. 2).

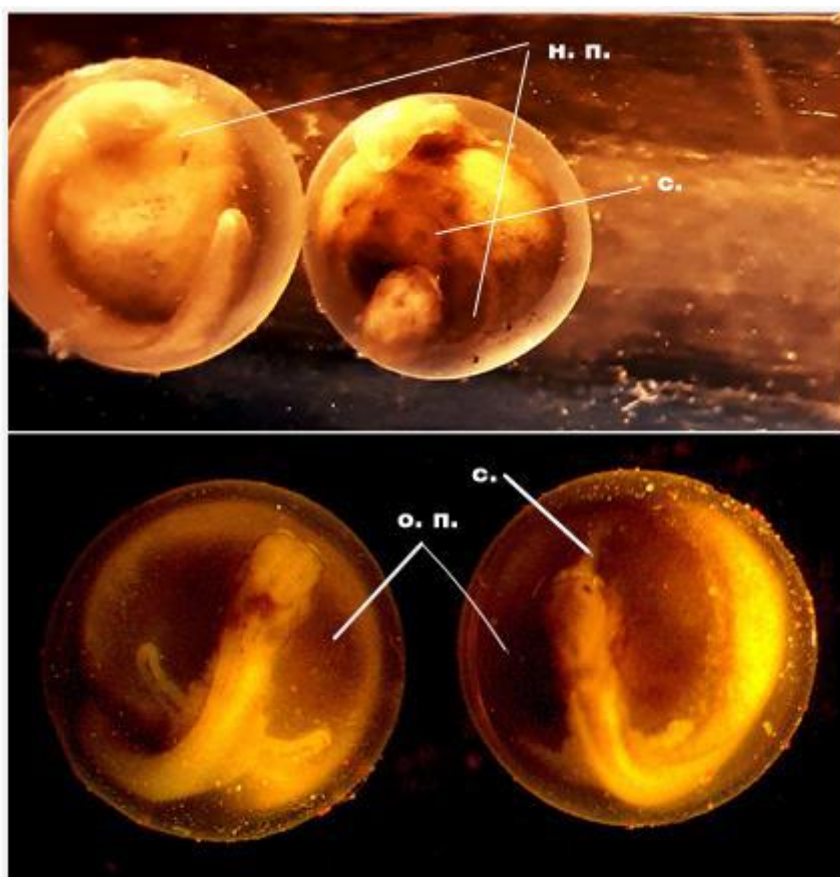


Рисунок 2 - Диплоидные и гаплоидные эмбрионы
о.п. — оводнение перикарда; *н. п.* — нормальный перикард; *с.* — сердце

На рисунке 3 представлены данные о выживаемости эмбрионов сибирского и русского осетров в зависимости от дозы облучения яйцеклеток. При облучении яйцеклеток сибирского осетра дозы задавали по времени облучения, а затем экспозиции сопоставляли с показаниями УФ-дозиметра (рис. 3а). При облучении яиц русского осетра поступили наоборот: дозы облучения задавали по показаниям дозиметра, а затем выражали их в величинах экспозиции (рис. 3б).

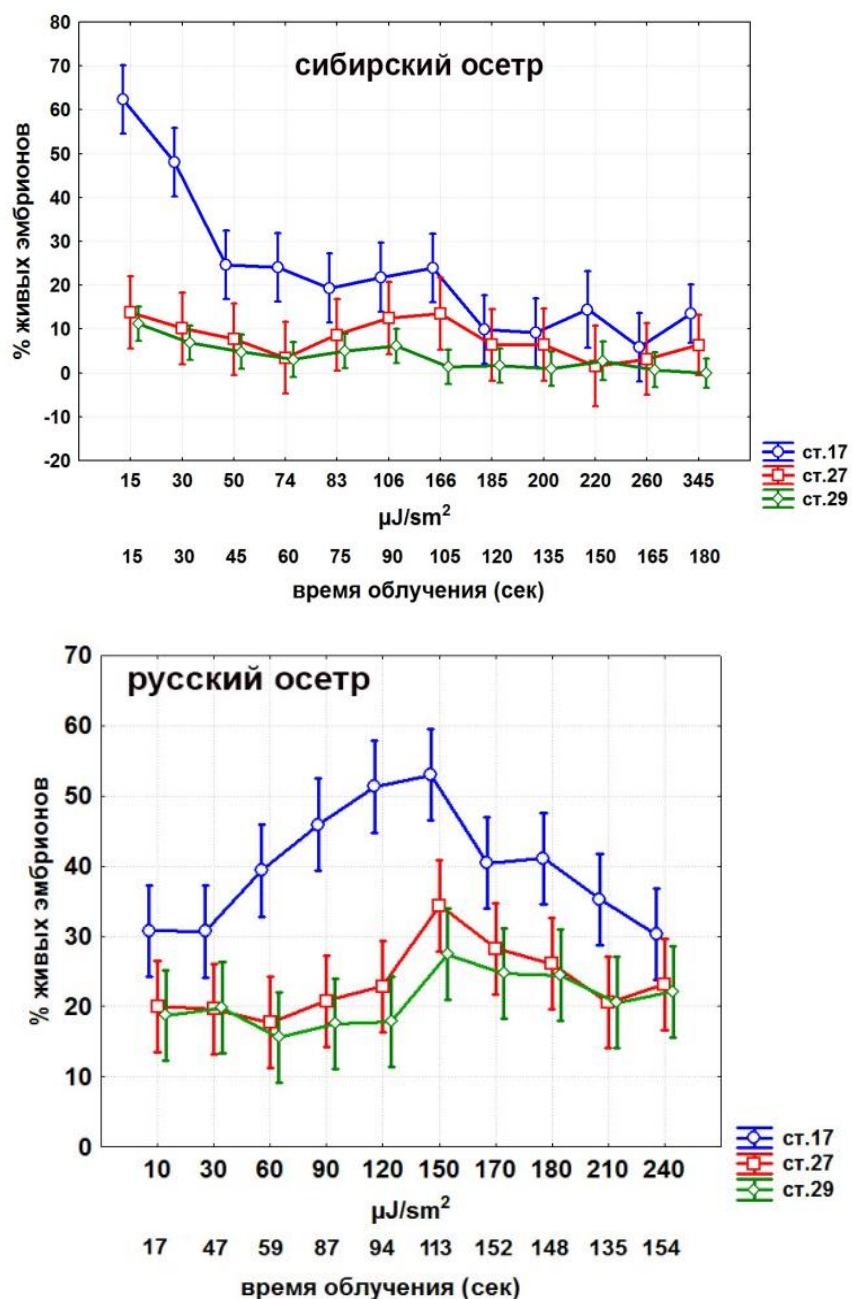


Рисунок 3 - Выживаемость эмбрионов сибирского (а) и русского (б) осетров на разных стадиях развития в зависимости от дозы облучения яйцеклеток.

И у сибирского, и у русского осетра максимальный подъем кривой выживаемости приходился на интервал 90-113 сек, или 150–180 мкДж/см². В этом же интервале доз наблюдали минимальную долю эмбрионов без признаков гаплоидного синдрома и максимальную долю эмбрионов с ярко выраженным гаплоидным синдромом (рис. 4).

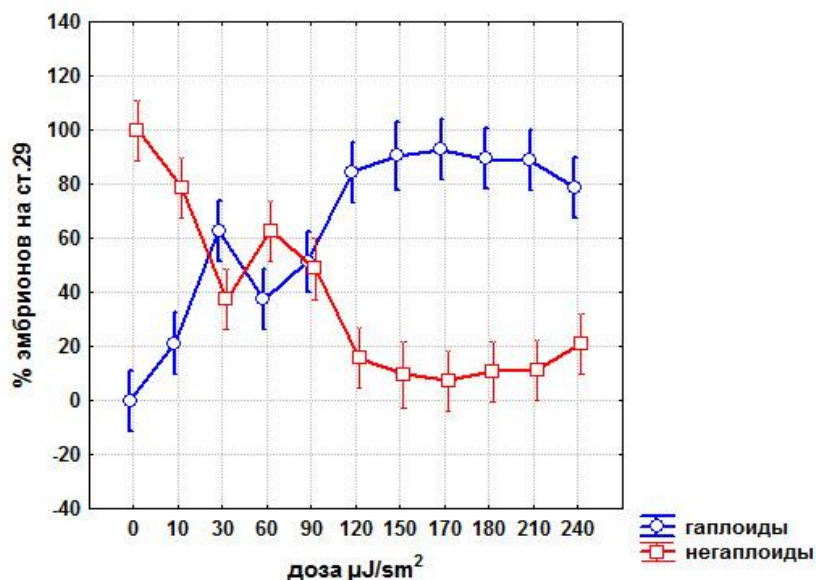


Рисунок 4 - Соотношение живых гаплоидных и негаплоидных эмбрионов в зависимости от дозы облучения

Влияние антиоксидантов. Добавление в среду для облучения антиоксидантов в различных концентрациях оказало положительный эффект на выживаемость андрогенетических эмбрионов на различных стадиях развития (рис. 5). Наибольшая выживаемость была установлена для раствора, содержавшего 150 mg/L глутатиона и 3 мг/л супероксиддисмутазы.

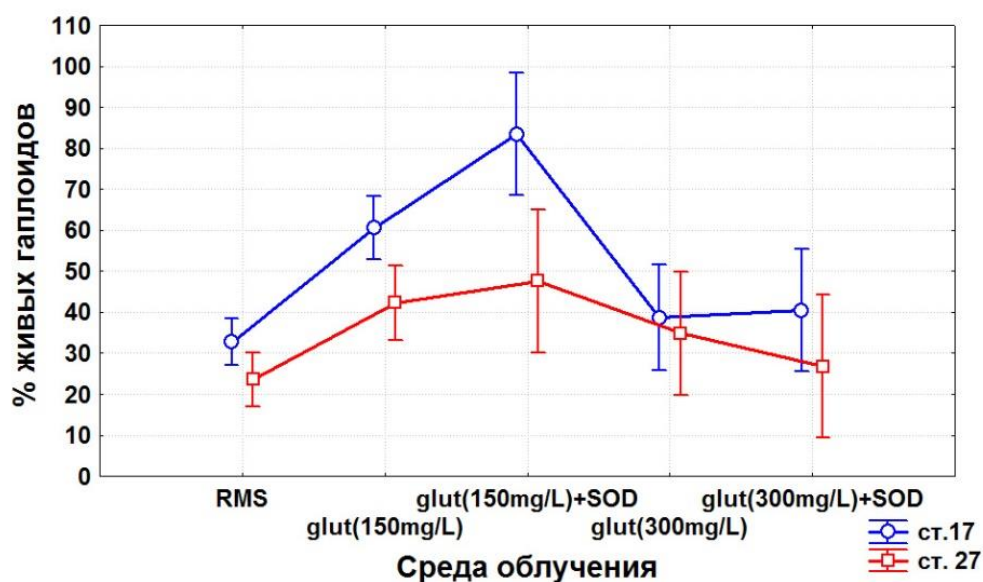


Рисунок 5 - Выживаемость эмбрионов сибирского осетра после УФ-облучения яйцеклеток в различных средах с добавлением антиоксидантов.

Обсуждение

Эффектом Гертвига [Hertwig, 1911] называется поведение кривой, описывающей гибель зародышей в зависимости от дозы облучения. С увеличением дозы гибель вначале закономерно растет, а затем парадоксально снижается. Такой характер кривой доза-эффект объясняется последовательным течением нескольких процессов.

Первоначальный рост числа погибших эмбрионов связан с быстрым накоплением в облученных хромосомах летальных повреждений, а 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].

На основании поведения кривой доза-эффект в наших опытах можно заключить, что при УФ-облучении яйцеклеток сибирского осетра полная их генетическая инактивация была достигнута в дозе 166 мкДж/см², а у русского осетра – в дозе 150 мкДж/см² (рис. 3). Максимальная доля эмбрионов сибирского осетра с выраженным гаплоидным синдромом наблюдалась при дозе облучения 170 мкДж/см² (рис. 4).

На рис. 3 показано, что время экспозиции в различных вариантах опыта не точно совпадает с накопленной дозой. Это можно объяснить тем, что интенсивность света при первоначальном включении холодной лампы возрастает со временем ее работы, а накопление дозы напрямую зависит от интенсивности. Максимальную интенсивность света (2000-2300 мкВт/см²) данная модель лампы в среде RMS набирает за 15-20 сек от холодного старта и далее работает с данной интенсивностью. Таким образом, если прогревать лампу в течение 15 сек, затем выключать и вносить в облучатель яйцеклетки, то интенсивность света от старта будет близка к максимальной, что приведет к накоплению дозы в 150 мкДж/см² за 1 мин 45 сек ± 5 сек., что составляет эффективную дозу инактивации женских хромосом в яйцеклетках русского осетра.

Нуклеиновые кислоты при УФ-облучении в основном повреждаются за счет фотохимических превращений пиримидиновых соединений. Основным инактивирующим ДНК процессом является образование оппозитных димеров тимина, сшивающих нити ДНК между собой [Rupert, 1975]. Однако белки и липиды, входящие в состав биологических мембран, также вовлечены в фотохимический процесс. УФ-инактивация белков выражается в потере их ферментативной, регуляторной, гормональной, транспортной и

иммунологической активности. Наиболее чувствительны к ультрафиолетовому свету серосодержащие и ароматические аминокислоты, входящие в состав белков. У серосодержащих аминокислот разрываются дисульфидные связи как при прямом воздействии ультрафиолета, так и в результате воздействия возбужденных продуктов фотолиза ароматических аминокислот. В липидной фазе мембран наиболее эффективно протекающей реакцией является перекисное, свободнорадикальное фотоокисление полиненасыщенных жирных кислот — фосфолипидов. Накопление перекисей, а также их дальнейшие превращения в альдегиды и кетоны, не только разрушают сами липиды, но и повреждают белки (прежде всего, сульфгидрильные группы), инактивируют многие ферменты, а также окисляют ряд биологически важных соединений [Конев, 1979].

Антиоксиданты всегда присутствуют в составе клетки, они защищают клеточные структуры от негативного воздействия перекисных соединений, а также восстанавливают окисленные формы макромолекул. Живая клетка использует три линии ферментативной защиты от активных кислородных соединений: при помощи супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы; глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы. Также выделяют еще и четвертую линию защиты – обезвреживание вторичных продуктов перекисления других окисленных соединений, в которой участвуют глутатионтрансфераза, глиоксилаза и формальдегиддегидрогеназа. Очевидно, что глутатион участвует в трех линиях защиты из четырех и, следовательно, вносит ощутимый вклад в функционирование антиоксидантной системы [Калинина и др., 2014; Толпыгина, 2012].

Восстановленный глутатион (GSH) – низкомолекулярный тиол, преобладающий во многих растительных, микробных и во всех животных клетках, причем его концентрация выше, чем концентрация большинства органических веществ [Meister, Anderson, 1983]. Его прямая функция – разрушение свободных радикалов. Глутатион в восстановленной форме, может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или напрямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов [Galano, 2011; Deponte, 2013].

Супероксиддисмутаза (SOD), как упоминалось выше, также принимает важнейшее участие в антиоксидантной линии защиты практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом, что обусловлено аэробной жизнью. SOD катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода, который расщепляется ферментом каталазой на воду и молекулярный кислород. Супероксиддисмутаза обладает совершенно феноменальной

активностью и крайне низкой эффективной концентрацией – она почти в сто раз активнее каталазы, а одна молекула каталазы за одну секунду способна разложить около миллиона молекул пероксида водорода.

При сочетании в среде для УФ-облучения яйцеклеток осетровых глутатиона и супероксиддисмутазы удалось снизить повреждение цитоплазматических структур яйцеклеток, что положительно сказалось на выживаемости эмбрионов (рис.5). Также было показано, что эффективность глутатиона зависит от его дозы. Пока установлено, что наибольший эффект он оказывает в концентрации 150 мг/л. Для определения минимально действующей концентрации GSH и максимально действующей концентрации SOD необходимы дополнительные исследования.

Список использованных источников

1. Балашов Д.А., Виноградов Е.В., Ковалев К.В., Барминцева А.Е., Рекубрятский А.В., Грунина А.С. Для получения индуцированного андрогенеза у осетровых рыб можно использовать ультрафиолетовое излучение // Онтогенез. 2017. Т. 48. №5. С. 386-396.
2. Гинзбург А.С., Детлаф Т.А. Развитие осетровых рыб. Созревание яиц, оплодотворение и эмбриогенез. М.: Наука, 1969. 134 с.
3. 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.
4. Грунина А.С., Рекубрятский А.В. Индуцированный андрогенез у рыб: получение жизнеспособных ядерно-цитоплазматических гибридов // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 4. С. 254–264.
5. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 299-348.
6. Конев С.В., Вологовский И.Д. Фотобиология. Минск: Изд-во БГУ им. В.И. Ленина. 1979. 385 с.
7. Рекубрятский 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.
8. Толпыгина, О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. № 2(84) ч.2. С.178-180.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013. V. 1830. P. 3217–3266.
14. Galano, A., Alvarez-Idaboy, J. R. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals // *RSC Advances.* 2011. V. 1. P. 1763–1771.
15. Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V. Induced androgenesis in fish: obtaining viable nucleocytoplasmic hybrids // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2005. V. 36. № 4. P. 208–217.
16. Kirankumar S., Pandian T.J. Production of androgenetic tiger barb, *Puntius tetrazona* // *Aquaculture.* 2003. V. 228. P. 37–51.
17. 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.
18. Meister A., Anderson M. E. (1983). Glutathione // *Annual review of biochemistry.* 1983. V. 52. № 1. P. 711-760.
19. 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.
20. 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.
21. Veprintsev B.N., Rott N.N. Conserving genetic resources of animal species // *Nature.* 1979. V. 280. P. 633–634.
22. Grunina A.S., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis // *Physiol. Gen. Biol. Rev.* 1997. V. 12. P. 73-103.
23. Hertwig O. Die radium Krankheit tierischer keim zellen // *Arch. Mikrosk. Anat.* 1911. V. 77. S. 1-97.
24. Rupert C. Enzymatic photoreactivation, overview // *Molecular mechanisms for repair of DNA.* New-York, London: Plenum-Press, 1975. Pt. A. P. 73-124.