

Федеральное агентство научных организаций
Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН
Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН
Российский фонд фундаментальных исследований

МОРСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием,
приуроченная к 145-летию
Севастопольской биологической станции*

Севастополь, 19–24 сентября 2016 г.

Сборник материалов

Том 1

Севастополь
ЭКОСИ-Гидрофизика
2016

УДК 574.5(063)
ББК 28.082.14
М 80

Редактор д.б.н., проф. А.В. Гаевская

Морские биологические исследования: достижения и перспективы :
М 80 в 3-х т. : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 19–24 сентября 2016 г.) / под общ. ред. А.В. Гаевской. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. – Т. 1. – 493 с.

ISBN 978-5-9907936-5-1

ISBN 978-5-9907936-6-8 (том 1)

Сборник подготовлен на основании материалов докладов, представленных на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. В первый том вошли статьи по истории морских фундаментальных и прикладных биологических исследований, биологии и экологии гидробионтов, экологической биоэнергетике, биохимии и генетике гидробионтов.

УДК 574.5(063)

ББК 28.082.14

Marine biological research: achievements and perspectives: in 3 vol. : Proceedings of All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation dedicated to the 145th anniversary of Sevastopol Biological Station (Sevastopol, 19–24 September, 2016). – Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2016. – Vol. 1. – 493 p.

Proceedings were prepared on the basis of reports submitted to the All-Russian scientific-practical conference with international participation dedicated to the 145th anniversary of Sevastopol Biological Station. The first volume includes articles on the history of marine biological research, biology and ecology of aquatic organisms, ecological bio-energetics, biochemistry and genetics of aquatic organisms.

Сборник издан при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-20627)

Редакционная коллегия не несет ответственности
за оригинальность и достоверность подаваемых авторами материалов

Печатается по решению ученого совета
Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН
(протокол № 7 от 24.06.2016 г.)

ISBN 978-5-9907936-5-1

ISBN 978-5-9907936-6-8 (том 1)

© Авторы статей, 2016
© Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, 2016
© Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, 2016

ОСЕТРОВЫЕ: ПОЛИПЛОИДИЯ, ГИБРИДЫ, КЛОНЫ

В. П. Васильев¹, Е. И. Рачек², Д. А. Медведев¹, Д. Ю. Амвросов², Е. Д. Васильева³

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Москва, РФ, vasvik1943@gmail.com

²Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Владивосток, РФ

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Зоологический музей, Москва, РФ

Проведены скрещивания гибридных самок (калуга х стерлядь) со стерлядью и с использованием инактивированной УФ облучением спермы стерляди и амурского осетра. Инактивированная сперма не способна к оплодотворению, но стимулирует развитие яйцеклеток. В результате в первом скрещивании были получены триплоиды, а в двух других скрещиваниях - клональные потомства.

Ключевые слова: осетры, клоны, гибриды, полиплоидия

Многие виды осетровых обладают исключительно высокой способностью к образованию жизнеспособных и более или менее плодовитых гибридов при искусственных скрещиваниях [1]. Это свойство осетровых широко используется для получения гибридов с хозяйственно ценными признаками, из которых наиболее удачными оказались гибриды белуга х стерлядь (бестер) и калуга х амурский осетр. Последний гибрид достаточно широко используется на осетровых фермах в Китае. В настоящее время продолжается поиск других хозяйственно ценных гибридов.

К настоящему времени изучены кариотипы практически всех (кроме *Acipenser dabryanus*) видов осетровых, у которых выявили три уровня ploидности: около 120 хромосом, 250-270 хромосом и около 370 хромосом [2, 3]; также исследовано достаточно большое число искусственных гибридов осетровых. Уже первые исследования показали, что результаты межвидовой гибридизации осетровых зависят от кариотипов родительских видов: виды с одинаковым уровнем ploидности часто дают нормально фертильных гибридов, способных успешно размножаться, тогда как размножение гибридов от видов с разным уровнем ploидности невозможно. Связано это со стерильностью или обоих полов, как, например, гибриды белуги с русским осетром [1], или со стерильностью самок. В последнем случае самцы могут быть частично фертильными, что показано для реципрокных гибридов осетра со стерлядью [4], гибридов стерляди с сибирским (ленским) осетром [5] и гибридов стерляди и калуги [6]. Возможно также, что самцы реципрокных гибридов русского осетра с севрюгой частично фертильны (самки стерильны) [7, 1]. Однако, известно, что в ряде случаев гибридные самки рыб могут быть плодовитыми не только при сходных кариотипах родительских видов, но и при существенных их различиях. Все известные клональные виды (формы) позвоночных имеют гибридное происхождение и представлены только самками, которые размножаются с помощью партеногенеза (рептилии) или гиногенеза (рыбы, амфибии).

Плодовитость гибридных самок обусловлена тем, что они продуцируют нередуцированные яйцеклетки, благодаря премейотической эндоредупликации хромосом и затем в первом делении мейоза конъюгируют не гомологичные, а возникшие сестринские хромосомы. В результате потомство таких самок генетически идентично матери, т.е. является клоном. В дальнейшем было обнаружено, что продуцирование искусственными гибридами рыб нередуцированных яйцеклеток - хотя и не частое явление, но достаточно обычное. К настоящему времени известно, что искусственные межвидовые

гибриды из различных групп рыб (Salmonidae, Cyprinidae, Cyprinodontidae, Oryziatidae, Centrarchidae) могут продуцировать нередуцированные яйцеклетки [8]. В ряде случаев показано, что в основе продуцирования искусственными гибридами нередуцированных гамет лежит премейотическая эндоредупликация хромосом. Что касается осетровых, то продуцирование нередуцированных гамет их гибридами не было известно. Необходимо, однако, отметить, что анализ происхождения гексаплоидии у осетровых (370 хромосом у *A. brevirostrum*) дает основания полагать, что гексаплоидия возникла в результате гибридизации видов с разными уровнями пloidности и образованием гибридов, которые продуцировали нередуцированные яйцеклетки [3].

Приведенные выше факты, а также исследование открытых нами клонально-бисексуальных комплексов рода *Cobitis* (Cobitidae) [9, 10] позволили поставить задачу получения клональных потомств осетровых рыб. Положительный результат этих исследований имеет крайне важное значение в осетроводстве и в познании механизмов полиплоидной эволюции осетровых. Для осетроводства будет решена актуальная задача получения однополо-женских потомств и получения стабильных линий гибридов от видов с различными уровнями пloidности. Таким образом, цель настоящей работы – получение клональных потомств осетровых. В качестве объектов исследования использованы стерлядь, *A. ruthenus* (диплоидный по происхождению вид, 120 хромосом) и калуга, *A. dauricus* (тетраплоидный по происхождению вид, число хромосом около 260).

Материал и методы. Экспериментальные исследования проводили на Лучегорской НИРС ТИПРО-Центра. Для решения поставленных задач проведены три скрещивания: ранее полученного гибрида (калуга х стерлядь) (самка) х стерлядь (самец), (калуга х стерлядь) х стерлядь и (калуга х стерлядь) х амурский осетр. В двух последних скрещиваниях сперма стерляди и амурского осетра была инактивирована.

В процессе выполнения работы использованы следующие методы. 1. *Методы индуцированного гиногенеза.* Получение инактивированных спермиев (такие спермии способны стимулировать развитие яйцеклетки, но не способны к оплодотворению) проводили с помощью их облучения УФ. Соответствующая методика описана во многих работах [см. 11]. 2. *Для цитогенетического анализа использовали головной лимфоидный орган.* Разработанная нами методика анализа кариотипов осетровых была опубликована ранее [12]. 3. *Анализ микросателлитов.* Анализ проводили по методике, предложенной в [13]. Праймеры для каждого микросателлитного локуса приведены ниже. 5'-конец прямых (F) праймеров модифицированы флуоресцентными красителями (FAM, HEX или TAMRA).

An20 - F:ААТААСААТСАТТАСАТГАГГСТ - HEX;

R:TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT

Afug41 - F:TGACGCACAGTAGTATTATTTATG – FAM;

R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC

Afug51 - F:АТААТААТГАГСГТГСТТТСТГТТ – HEX;

R:АТТССГСТТГСГАСТТАТТТА

AoxD165 - F:ТТТГАСАГСТССТААГТГАТАСС - TAMRA;

R:АААГСССТАСААСАААТГТСАС

AoxD161 - F:GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC – FAM;

R:TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC

Результаты и обсуждение. Анализ кариотипов сеголетков возвратных гибридов (калуга х стерлядь) х стерлядь показал, что гибриды (все или большая их часть) имеют около 250 хромосом. Поскольку кариотип калуги включает около 260 хромосом [14], а

кариотип стерляди около 120 [15], то гибрид калуга х стерлядь должен иметь около 190 хромосом. Таким образом, кариотип возвратных гибридов мог возникнуть при оплодотворении нередуцированной яйцеклетки гибридной самки гаплоидным спермием стерляди (190 хромосом + 60 хромосом), при этом сами возвратные гибриды оказались триплоидными. Доказательство факта продуцирования гибридами нередуцированных яйцеклеток однозначно свидетельствует о возможности получения клональных линий при использовании инактивированных спермиев.

Для получения потомства от гибридной самки калуга х стерлядь были поставлены два скрещивания: с амурским осетром и стерлядью. В обоих случаях сперма была инактивирована. Успешность инактивации подтверждена анализом микросателлитов и кариотипов. В связи с этим выборки от двух скрещиваний можно объединить в одну. Таким образом, исследованная выборка потомства от самки калуга х стерлядь составила 20 экз. (по 10 от каждого скрещивания). Аллельная структура пяти микросателлитных локусов самки калуга х стерлядь оказалась следующей: микросателлит AoxD251 - три аллеля (102, 114, 122), микросателлит Afug41 - один аллель (229), микросателлит An20 - три аллеля (155, 165, 169), микросателлит Afug51 - один аллель (236), AoxD165 - три аллеля (190, 198, 216). Сравнение аллельной структуры исследованных микросателлитных локусов гибридной самки и потомства показало полную идентичность, т.е. имеет место клональное наследование, а само потомство является клоном гибридной самки калуга х стерлядь. Таким образом, нам впервые удалось получить клональное потомство осетровых рыб.

Выводы. Впервые получено клональное потомство осетровых рыб. Технология получения клонального потомства одновременно является технологией получения однополо-женских потомств: так клоны от самок всегда будут самками. Искусственное получение клональных линий гибридов позвоночных можно рассматривать как экспериментальное воспроизведение первого этапа сетчатого видообразования. Факт возможности продуцирования гибридами осетровых, полученных от видов различного уровня пloidности, нередуцированных яйцеклеток имеет большое значение для познания полиплоидной эволюции осетровых.

Благодарности. Авторы глубоко благодарны сотрудникам ВНИРО А.Е. Барминцевой и Н.С. Мюге за помощь в обработке материала по микросателлитам. Исследования проводятся авторами при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-04-03145) и ФЦП по разработке методов мониторинга и сохранения биологического разнообразия (соглашение № 14.604.21.0129, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0129); подготовка материалов для депонирования и обработка музейных коллекций – при поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00029).

1. Николокин Н.И. Отдаленная гибридизация рыб. - Москва: Пищевая пром-сть, 1972. 336 с.
2. Fontana F., Congiu L., Mudrak V.A., Quattro J.M., Smith T.I., Ware K., Doroshov S. Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon // *Genome*. 2008. V. 51, № 2. P. 113–119.
3. Vasil'ev V.P. Mechanisms of polyploidy evolution in fish: polyploidy in sturgeons // *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series*. V. 29. (Carmona R., Domezain A., Garcia-Gallego M., Hernando J.A., Rodriguez F., Ruiz-Rejón M., eds.). Netherlands: Springer. 2009. P. 97-117.
4. Бурцев И.А. О воспроизводительной способности гибрида осетра со стерлядью // *Доклады АН СССР*. 1962. Т. 144, № 6. С. 1377-1379.

5. Подушка С.Б. Стерильны ли «стерильные» гибриды осетровых? // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. III Международная научно-практическая конференция. Материалы докладов. Астрахань: "Альфа-Аст". 2004. С.202-203.
6. Рачек Е.И., Свирский В.Г. Индустриальное рыбоводство в ТИНРО-Центре (2000-2010 гг., или 10 лет спустя) // ТИНРО-85. Итоги десятилетней деятельности. 2000-2010 гг.: Сборник статей. Владивосток: ТИНРО-Центр. 2010. С. 225-245.
7. Бурцев И.А. Влияние питания на гаметогенез некоторых гибридов осетровых рыб при прудовом выращивании // Обмен веществ и биохимия рыб. Москва: Наука. 1967. С. 241-243.
8. Васильев В.П., Васильева Е.Д. Сетчатое видообразование и полиплоидная эволюция у рыб // Актуальные проблемы современной ихтиологии (к 100-летию Г.В. Никольского). Сборник статей. Москва: Т-во научных изданий КМК. 2010. С. 148-177.
9. Васильев В.П., Васильева Е.Д. Новый диплоидно-полиплоидный комплекс у рыб // Доклады АН СССР. 1982. Т. 266, № 1. С. 250-252.
10. Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Osinov A.G. Evolution of a diploid-triploid-tetraploid complex in fishes of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae) // Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. R.M. Dawley & J.P. Bogart (ed.). Bull. 466. N.Y. State Museum. Albany. N.Y. 1989. P. 153-169.
11. Бадртдинов О.А., Ковалев К.В., Лебедева Е.Б., Васильева Е.Д., Рекубратский А.В., Грунина А.С., Чебанов М.С., Васильев В.П. Однополо-мужской состав гиногенетического потомства севрюги *Acipenser stellatus* (Pisces, Acipenseridae) // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 423, № 1. С. 1-4.
12. Васильев В.П., Соколов Л.И. Метод изучения кариотипов хрящевых ганоидов // Цитология. 1980. Т. 22, № 9. С. 1106-1109.
13. 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.
14. Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В. Уровень ploidyности калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426, № 2. С. 275-278.
15. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. Москва: Наука. 1985. 300 с.

ACIPENSERIDAE: POLYPLOIDY, HYBRIDS, CLONES

V. P. Vasil'ev¹, E. I. Rachek², D. A. Medvedev¹, D. Yu. Amvrosov², E. D. Vasil'eva³

¹Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, RF, vasvik1943@gmail.com

²Pacific Fisheries Research Center, Vladivostok, RF

³Lomonosov Moscow State University, Zoological Museum, Moscow, RF

The crossbreeding between hybrid females (kaluga sturgeon x sterlet sturgeon) and intact sterlet sturgeon was conducted, as well as the crosses performed by using UV-irradiation inactivated sperm from sterlet and Amur sturgeons. The inactivated sperm incapable of fertilization, but it stimulates the development of eggs. As a result, the triploid progeny was obtained in the first mating, whereas the other two crosses resulted in clonal progenies.

Key words: sturgeons, clones, hybrids, polyploidy