

**ЖИЗНЕСПОСОБНОЕ ГИНОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОТОМСТВО
СИБИРСКОГО ОСЕТРА ACIPENSER BAERI BRANDT
(PISCES, ACIPENSERIDAE), ПОЛУЧЕННОЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЯЙЦЕКЛЕТОК, ОВУЛИРОВАВШИХ IN VITRO**

© 2010 г. А. С. Грунина, М. Н. Скоблина, Б. Ф. Гончаров,
А. В. Рекубратский, К. В. Ковалёв, А. Е. Барминцева

Представлено академиком Д.С. Павловым 15.09.2009 г.

Поступило 28.09.2009 г.

Согласно литературным данным, некоторым видам, а также гибридам осетровых рыб свойственна гетерогаметность женского пола (ZW самки и ZZ самцы). Этот вывод сделан на основании обнаружения в их гиногенетических потомствах как самок, так и самцов [1–3]. В данном случае индуцированный гиногенез, позволяющий получать бисексуальные потомства, может рассматриваться как метод сохранения или даже восстановления генофондов исчезающих видов.

Очевидно, что поимка половозрелой самки исчезающего вида является событием редким. При получении потомства от такой уникальной особи использование обычного метода получения зрелых яйцеклеток с помощью гормональной индукции созревания ооцитов *in vivo* может оказаться неприемлемым. Так, в случае неудачи, связанной с неадекватностью гормональной обработки физиологическому состоянию самки, применение этого метода может отложить работу с самкой на год или более или приведет ее к гибели, как это бывает при аномальной атрезии созревших, но не овулировавших ооцитов. В качестве альтернативы для получения зрелых яйцеклеток приемлемым оказывается метод гормональной индукции созревания и овуляции ооцитов *in vitro*. В этом случае овариальные фолликулы извлекаются из тела самки с помощью специального щупа, что является вполне безопасной процедурой, которую можно проводить многократно вплоть до получения желаемого результата. Использование данного метода на севрюге *Acipenser stellatus* позволило

получить до 90% овулировавших ооцитов, 60% которых после оплодотворения нормально развивались и достигали стадии предличинок, перешедших на экзогенное питание [4]. В настоящей работе на сибирском осетре *A. baeri* как модели мы исследовали возможность использования мейотического гиногенеза в сочетании с методом гормональной индукции созревания и овуляции ооцитов *in vitro* для воссоздания исчезающих видов осетровых рыб с женским типом гетерогаметности.

Материалом служили половые продукты, полученные от двух самок сибирского осетра (самка № 1 и самка № 2) и самца белуги *Huso huso*, выращенных на Конаковском заводе товарного осетроводства (Тверская область). Овариальные фолликулы были извлечены из тела самки с помощью специального щупа и через 6 ч доставлены в охлажденной 75%-ной среде Лейбовитца в Институт биологии развития РАН. Перед началом опыта фолликулы тщательно отмывали модифицированным раствором Рингера для холоднокровных, содержащем 0.5 г/л бикарбоната натрия, а также антибиотики (пенициллин и стрептомицин). Фолликулы инкубировали в том же растворе с прогестероном (100 нг/мл, 0.1% спирта) при температуре $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Для определения овуляции фолликулы просматривали под бинокулярным микроскопом. Когда при очередном просмотре всех фолликулов от одной самки число овулировавших ооцитов превышало 50, их отбирали и использовали для дальнейшей обработки.

Для индукции гиногенетического развития порции овулировавших ооцитов оплодотворяли генетически инактивированной спермой белуги. Инактивацию спермиев осуществляли с помощью коротковолнового ультрафиолетового излучения (УФ-лампа, 15 Вт, расстояние от лампы до спермы 42 см) с экспозицией 5 мин. Для получения мейотического гиногенеза применяли тепловой шок при 36°C в течение 2 мин через $0.3\tau_0$ [5]

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской Академии наук, Москва*

*Всероссийский научно-исследовательский институт
пресноводного рыбного хозяйства,
пос. Рыбное Московской обл.*

*Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии, Москва*

Таблица 1. Результаты эксперимента по мейотическому гиногенезу (число живых особей)

Вариант	Число осемененных яйцеклеток	Гастроула	Нейрула	Вылупление	2-месячная молодь
Самка № 1					
Интактный контроль	25	19	19	17	16
Гаплоидный контроль	30	6	6	6	0
Эксперимент	153	64	56	45	25*
Самка № 2					
Эксперимент	66	25	25	20	—

* Гиногенетические потомства, полученные от двух самок, выращиваются совместно.

Таблица 2. Результаты анализа микросателлитной ДНК у родительских особей сибирского осетра (самка № 1) и белуги, а также у личинок из экспериментального и контрольных вариантов

Особь	Afug41	AoxD165	AoxD161
Самка (<i>A. baerii</i>)	A B C D 197 205 209 237	A B C D 176 178 192 196	B C D E 308 316 336 340
Самец (<i>Huso huso</i>)	E F 241 245	B B 178 178	A A 304 304
Личинки			
Интактный контроль	ACE ACE BDF ADE CDE BDF ADF	BBC BBC BBD BBD BBC ABD BBD	ABC ABC ABC ABD ABD ACD ACD
Гаплоидный контроль	BC CD	BC AC	CD CE
Эксперимент	ABCD ABCD ABCD ABCD ABBD ABCD BCCD ACDD ABCD	BVCC AADD CCDD AADD AADD BVDD BVCC CCDD BVDD	BVDD CCEE VCEE BVDD VCDD VCEE VCEE BVDD BVDD

Примечание. Латинские буквы A, B, C, D, E, F соответствуют аллелям различного размера. Размеры аллелей указаны в парах нуклеотидов.

после осеменения [6]. Часть зародышей теплового шоку не подвергали и использовали для контроля инактивации спермы (гаплоидный контроль). Для контроля качества половых продуктов зрелые яйцеклетки оплодотворяли интактной спермой (интактный контроль).

Качество половых продуктов оказалось довольно высоким, так как в интактном контроле

64% осемененных яйцеклеток развились в нормальную молодь. Зародыши, полученные в результате оплодотворения ооцитов облученной спермой (гаплоидный контроль), имели ряд морфологических аномалий и погибали вскоре после вылупления. Это свидетельствовало о полной генетической инактивации спермиев и индукции гиногенетического развития. Потомства же, полученные в результате использования метода

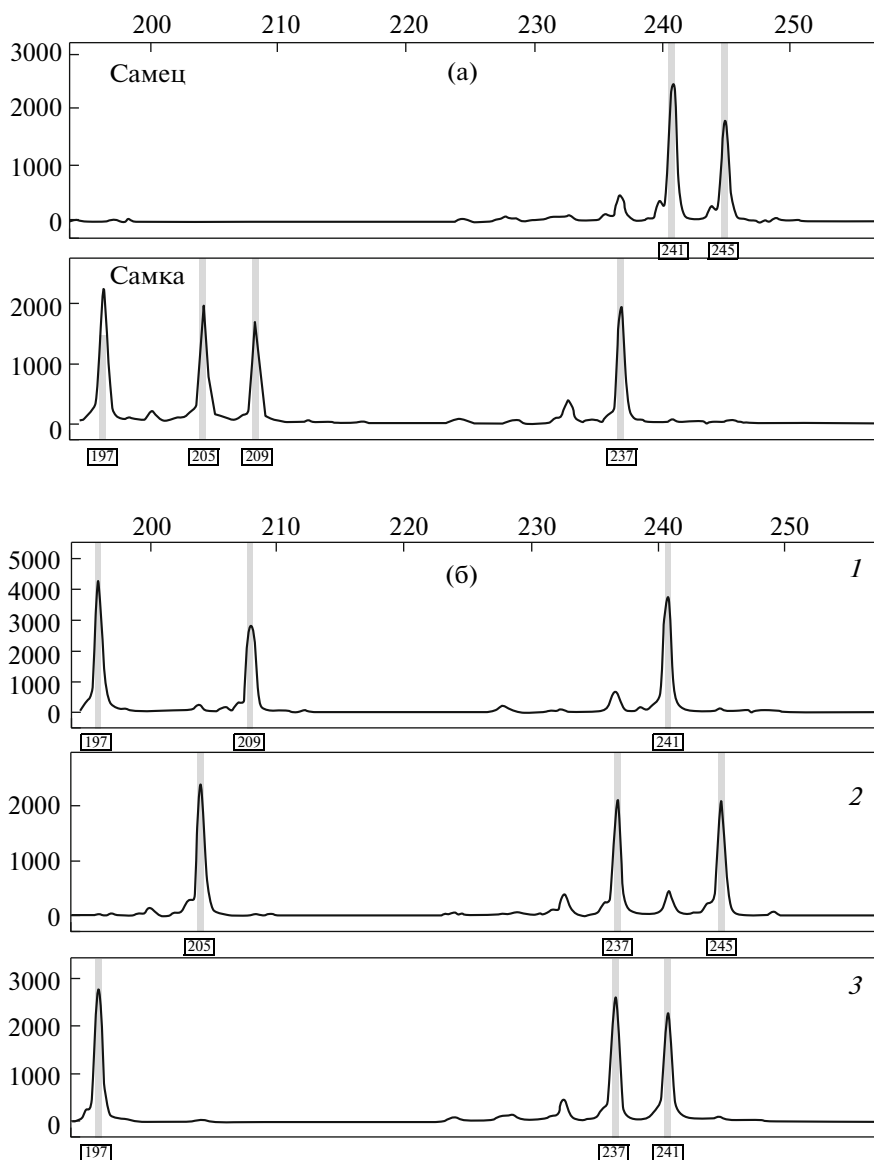


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации по локусу Afug 41 у родительских особей (самка № 1 сибирского осетра и самец белуги) (а), а также у личинок из интактного контроля (б), гаплоидного контроля (в) и экспериментального варианта (г). Каждый из кадров (б: 1–3; в: 1, 2; г: 1–4) отличается разными комбинациями аллельного состава. По горизонтальной оси указан размер аллелей в парах нуклеотидов, по вертикали – интенсивность пиков в относительных флуоресцентных единицах.

мейотического гиногенеза (облучение спермы и тепловой шок), были жизнеспособны. Их выживаемость была сходной с выживаемостью аналогичных потомств, полученных ранее с использованием яйцеклеток, созревших и овулировавших *in vivo* [6]. Из-за ограниченного количества овулировавших ооцитов от одной самки (самка № 2) контрольные варианты на ооцитах этой самки поставлены не были. Однако гиногенетическая природа экспериментального потомства, полученного от этой самки, была впоследствии подтверждена с помощью анализа микросателлитной ДНК (данные не приводятся). Результаты экспе-

римента по мейотическому гиногенезу приведены в табл. 1.

Для подтверждения гиногенетической природы экспериментальных потомств использовался анализ ядерной ДНК по трем микросателлитным локусам: Afug 41, AoxD165 и AoxD161 [7–9], по которым выявлены различия аллельного состава у родительских особей. Анализ индивидуальных микросателлитных локусов проводили путем амплификации с праймерами, комплементарными к уникальным последовательностям, которые фланкируют повторяющуюся область. Один из праймеров был модифицирован флуоресцентной

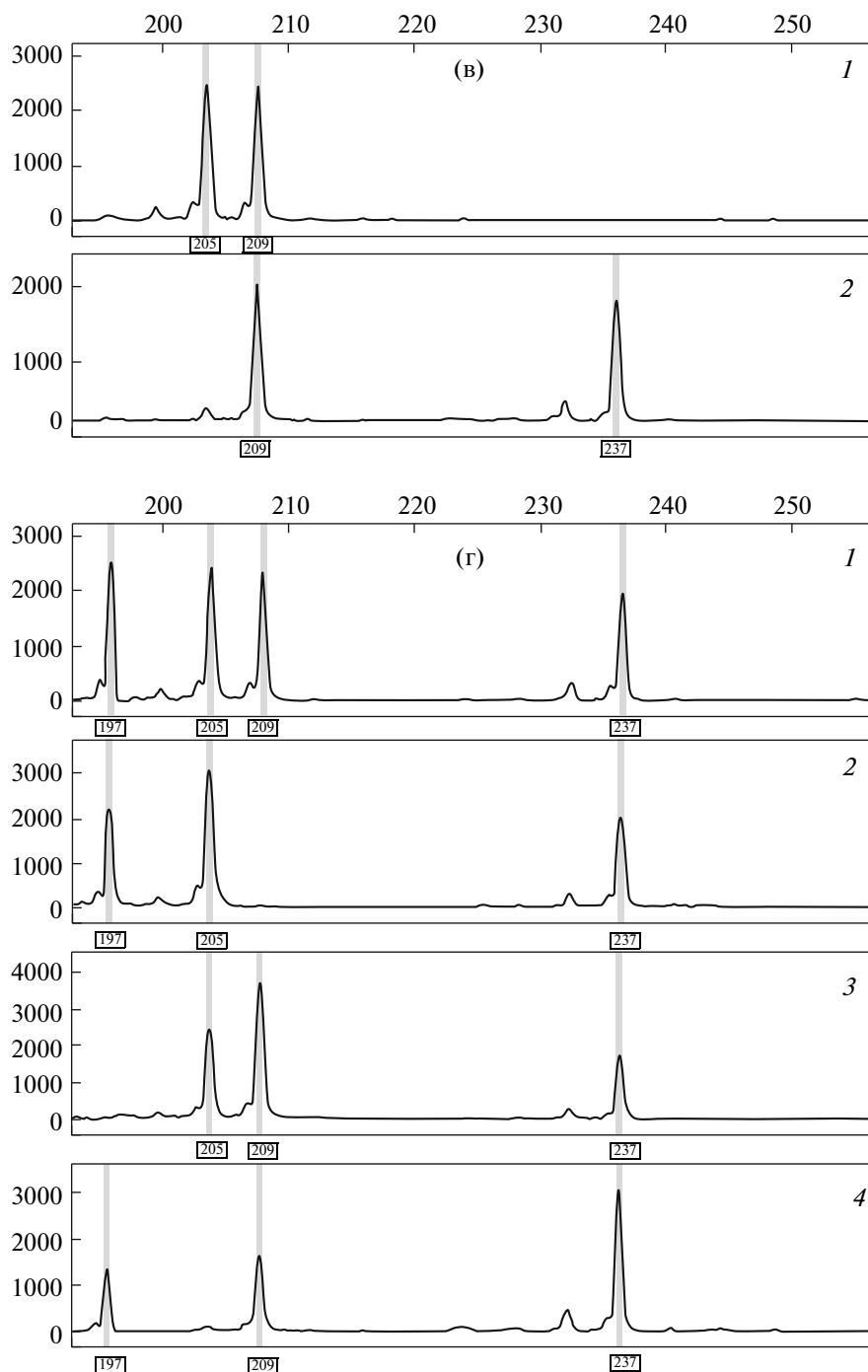


Рис. 1. Окончание.

меткой. В дальнейшем проводили электрофоретическое разделение полученных фрагментов при помощи капиллярного электрофореза на приборе 3100 Genetic Analyzer; результаты обрабатывали, используя программу GeneMarker (рис. 1).

Результаты микросателлитного анализа показали, что особи в контрольном варианте опыта, полученные от обычного скрещивания родитель-

ских самок сибирского осетра и самца белуги, являются триплоидными гибридами и имеют по два материнских и одному отцовскому аллелю каждого локуса (рис. 1а, б, табл. 2). Эти результаты согласуются с данными о пloidности сибирского осетра и белуги, являющихся тетраплоидным и диплоидным видами соответственно [10]. У особей, полученных в результате скрещиваний с использованием облученной спермы как в гаплоид-

ном контроле (без применения теплового шока), так и в вариантах с применением теплового шока для блокирования второго деления мейоза обнаружены исключительно материнские аллели исследуемых микросателлитных локусов. При этом особи в гаплоидном контроле имели по два аллеля материнского происхождения (рис. 1а, в, табл. 2), а в экспериментальном варианте – различные комбинации из четырех материнских аллелей (рис. 1а, г, табл. 2). У четырех из девяти личинок экспериментальной группы анализ по локусу AoxD165 выявил наличие аллеля В (размер 178 п.н.), присутствующего как в материнском, так и отцовском геноме (табл. 2). Однако характер наследования по двум другим локусам подтверждает материнскую природу данного аллеля у этих личинок. Полученные данные свидетельствуют о полной генетической инактивации спермиев в результате облучения и успешной индукции мейотического гиногенеза.

Таким образом, нами впервые получено жизнеспособное гиногенетическое потомство осетровых рыб с использованием ооцитов, созревших и овулировавших под действием гормональной обработки вне тела самки. Результаты настоящего исследования подтверждают принципиальную возможность использования данного подхода для сохранения или воссоздания генофондов исчезающих видов осетровых рыб с женским типом гетерогаметности. При этом для получения гиноге-

неза может использоваться сперма любого доступного вида осетровых рыб.

Работа финансировалась грантом РФФИ 09–04–01695.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Van Eenennaam A.L., Van Eenennaam J.P., Medrano J.F., Doroshov S.I.* // J. Heredity. 1999. V. 90. P. 231–233.
2. *Flynn S.R., Matsuoka M., Reith M. et al.* // Aquaculture. 2006. V. 253. P. 721–727.
3. *Omoto N., Maebayashi M., Adachi Sh. et al.* // Aquaculture. 2005. V. 245. P. 39–47.
4. *Goncharov B.F., Skoblina M.N., Trubnikova O.B., Vassetzky S.G.* In: Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series. Netherlands: Springer, 2008. V. 29. P. 175–185.
5. *Detlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I.* Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. B.: Springer-Verlag, 1993. 300 p.
6. *Рекубратский А.В., Грунина А.С., Барминцев В.А. и др.* // Онтогенез. 2003. Т. 32. № 2. С. 121–131.
7. *Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al.* // Mol. Ecol. Notes. 2002. № 2. P. 586–588.
8. *Welsh A.B., Blumberg M., May B.* // Mol. Ecol. Notes. 2003. № 3. P. 47–55.
9. *Henderson-Arzapalo A., King T.L.* // Mol. Ecol. Notes. 2002. № 2. P. 437–439.
10. *Васильев В.П.* Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 300 с.