ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 2, с. 133–145

ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ

УДК 591.392

ДИСПЕРМНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ У ОСЕТРОВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ: ПОЛУЧЕНИЕ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТОМСТВА СИБИРСКОГО ОСЕТРА И АНДРОГЕНЕТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ СИБИРСКИМ И РУССКИМ ОСЕТРАМИ[1]

© 2011 г. А. С. Грунина, А. В. Рекубратский*, Л. И. Цветкова*, А. Е. Барминцева, Е. Д. Васильева***, К. В. Ковалев*, О. Г. Полуэктова****

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: asgrunina@gmail.com

**Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, 141821 п. Рыбное, Московская область*

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

****Зоологический музей МГУ, 125009 Москва, ул. Большая Никитская, д. 6*

Поступила в редакцию 28.06.2010 г.
Окончательный вариант получен 07.10.2010

Впервые благодаря применению метода диспермного андрогенеза получены андрогенетическое потомство сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды (сибирский осетр, *Acipenser baerii* × русский осетр, *A. gueldenstaedtii*) у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы. С помощью анализа микросателлитной ДНК подтверждена чисто отцовская наследственность у андрогенетического потомства сибирского осетра. Среди андрогенетических гибридов выявлены гетерозиготы по некоторым микросателлитным локусам, что подтверждает диспермную природу андрогенеза. По данным сравнительного морфологического анализа полученный андрогенетический гибрид к 15-месячному возрасту полностью идентичен отцовскому виду. В полученных андрогенетических потомствах осетровых рыб выявлены как самка, так и самец, что представляет интерес с точки зрения возможности получения с помощью андрогенеза бисексуальных потомств. Данные настоящего исследования подтверждают возможность применения метода диспермного андрогенеза в сочетании с использованием криоконсервированной спермы для сохранения и воссоздания генофондов исчезающих видов осетровых рыб.

Ключевые слова: диспермный андрогенез, осетровые рыбы, криоконсервированная сперма, микросателлитный анализ, гетерозиготность, андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды, сравнительный морфологический анализ, определение пола, гистологический анализ.

Индуцированный андрогенез является методом получения организмов с исключительно отцовской ядерной наследственностью и традиционно применяется в генетике и биологии развития для получения высокоинбредных линий и клонов, изучения взаимоотношений ядра и цитоплазмы, регуляции пола и др. 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; Grunina et al., 1990; Corley-Smith, Brandhorst, 1999). Значение этого подхода к проблеме сохранения ценных генофондов в существенной мере определяется тем, что технология длительного хранения спермы рыб посредством криоконсервации уже в основном разработана (Suquet et al., 2000).

Для получения диплоидного андрогенеза необходимо вызвать инактивацию ядер яйцеклеток и диплоидизацию (удвоение) мужского хромосомного комплекса. К настоящему времени диплоидный андрогенез успешно осуществлен у ряда видов костистых рыб с помощью радиационной инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужских хромосом за счет блокирования первого деления дробления у андрогенетических гаплоидных зародышей (см. обзоры: Penman et al., 1996; Grunina, Neyfakh,

[1] Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 09-04-01695, 06-04-49637 и 07-04-00219) и подпрограммой “Биоразнообразие” Президиума РАН (проект № 6.1.8).

1997). Однако полученные нами тем же способом андрогенетические диплоиды осетровых рыб оказались нежизнеспособны вследствие повышенной чувствительности этих рыб к высокому уровню гомозиготности, возникающей в результате блокирования первого деления дробления (Грунина, Нейфах, 1991). Между тем работы в данном направлении на осетровых рыбах имеют первостепенное значение, поскольку многие виды и популяции этих рыб близки к исчезновению (Birstein et al., 1997).

Для преодоления гомозиготности андрогенетических особей нами применительно к осетровым рыбам разработан метод диспермного андрогенеза. Данный метод предполагает диплоидизацию за счет слияния хромосомных наборов двух спермиев, что приводит к получению гетерозиготного потомства с обычным уровнем генетической изменчивости. Разработанный метод диспермного андрогенеза основывается на биологических особенностях осетровых рыб – наличии в яйцеклетках нескольких микропиле и физиологической моноспермии (отсутствие в яйцеклетках механизмов, блокирующих сверхчисленные спермии) (Гинзбург, 1968) – и включает радиационную инактивацию ядер яйцеклеток, полиспермное оплодотворение и тепловой шок, способствующий слиянию мужских пронуклеусов. С помощью этого метода нами были впервые получены жизнеспособные андрогенетические потомства у нескольких видов осетровых рыб (Grunina et al., 1995; Recoubratsky et al., 1996; Грунина, Рекубратский, 2005), а также жизнеспособные андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды (Грунина, Рекубратский, 2005; Grunina et al., 2009). Получение подобных гибридов является необходимым условием, определяющим возможность использования андрогенеза для восстановления редких и исчезающих видов. При этом предполагается, что, оплодотворяя нативной или криоконсервированной спермой такого вида генетически инактивированные яйцеклетки доступного близкого вида и используя метод диплоидного андрогенеза, можно воссоздать исчезающий вид (Grunina, Neyfakh, 1997).

В данном сообщении отражены последние результаты наших исследований по диспермному андрогенезу у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы. Впервые приводятся данные о получении таким путем андрогенетического потомства сибирского осетра (*Acipenser baerii*) и андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов. В качестве экспериментальных объектов для получения этих гибридов использованы сибирский (*A. baerii*) и русский (*A. gueldenstaedtii*) осетры (соответственно, материнский и отцовский виды). Для подтверждения чисто отцовской наследственности у андрогенетических особей сибирского осетра, а также андрогенетической природы полученных ядерно-цитоплазматических гибридов использован микросателлитный анализ. Для идентификации андрогенетических гибридов использован сравнительный морфологический анализ. Также впервые приводятся данные по изучению пола у андрогенетических осетров, в том числе с использованием гистологического анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. Эксперименты по индуцированному андрогенезу проводились в 2006–2008 гг. в Институте биологии развития РАН. В качестве материала использовали половые продукты, полученные от производителей сибирского осетра, содержащихся на Конаковском заводе товарного осетроводства (Тверская область), а также криоконсервированную сперму русского осетра, заготовленную на рыбоводных заводах Краснодарского края. До использования в опытах эта сперма хранилась в криобанке в течение 2-х лет.

В опытах использовали яйцеклетки сибирского осетра, криоконсервированную или нативную сперму сибирского осетра и криоконсервированную сперму русского осетра. В каждом опыте использовали яйцеклетки, полученные от одной-трех самок, и смесь спермы от трех самцов для каждого вида.

Замораживание и размораживание спермы

Сперму замораживали в 1.5 мл центрифужных пробирках по стандартной методике (Tsvetkova et al., 1996). Криозащитная среда содержала метанол (10%), сахарозу (7%) и антифризные белки. Для размораживания пробирки помещали на 1 мин в водяную баню (40°C), затем полуразмороженную сперму извлекали из пробирок, разбавляли водой и приливали к икре. Через 3 мин после осеменения яйцеклетки отмывали от криопротектора путем трехкратной смены воды.

Получение андрогенетического потомства

Для инактивации ядер яйцеклетки подвергали рентгеновскому облучению в дозе 220 Гр. Затем, спустя 1.4–1.6 τ_0 (τ_0 см. Dettlaff et al., 1993) после осеменения нативной (разбавление водой 1 : 10) или размороженной (разбавление 1.5 : 10) спермой, их подвергали тепловому шоку при 37°C в течение 2 мин. Ранее установлено, что шок в период развития от 1.4 до 1.6 τ_0 является оптимальным для индукции диплоидного андрогенеза за счет слияния ядер спермиев (диспермный андрогенез) у осетровых рыб (Recoubratsky et al., 1996). Меньшее разбавление криоконсервированной спермы было взято исходя из того, что часть спермиев после процедур замораживания и оттаивания теряет подвижность. При получении обычного (интактного) потомства сперму разбавляли в соотношении 1 : 100, что позволяло избежать полиспермного оплодотворения.

В параллельных вариантах опытов для сравнения результатов использовали криоконсервированную и нативную сперму.

В каждом опыте по диспермному андрогенезу, помимо экспериментальных андрогенетических диплоидных потомств (АД – диплоидный андрогенез), были получены следующие контрольные варианты: КД (контроль диплоидный) – обычное скрещивание без применения экспериментальных воздействий; КГ (контроль гаплоидный) – андрогенетическое потомство (облучение икры), полученное без применения теплового шока. В контрольных вариантах были использованы те же гаметы, что и в опытных. Все варианты опытов проводились в трех-четырех повторностях.

Инкубация эмбрионов и выращивание личинок

Эмбрионов инкубировали в чашках Петри диаметром 90 мм (100–150 шт. на чашку) при комнатной температуре. Регулярно отбирали погибших эмбрионов. Полученных личинок после перехода на экзогенное питание переводили на выращивание в аквариальную ИБР РАН, где они содержались при температуре около 20°С и получали живые и искусственные корма.

Молекулярно-генетический анализ

Для анализа ДНК образцы тканей рыб фиксировали в 96%-ном этаноле. Из полученных образцов выделяли ДНК методом фенольно-хлороформовой экстракции (Blin, Stafford, 1976) с небольшими модификациями. Фрагмент плавника (2–5 мг), хвостовую часть личинки или эмбрион помещали в 400 мл лизирующего раствора (100 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 100 мМ EDTA pH 8.0, 1% додецил сульфат натрия и 2 мкл раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл) и интенсивно перемешивали. Образцы инкубировали при 55°С в течение ночи, после чего к каждому образцу добавляли 400 мкл фенола. Образцы тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин при 15000 g. Супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем хлороформ-изоамила (24 : 1) перемешивали и опять центрифугировали 15 мин при 15000 g. Супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и инкубировали пробирки 30 мин при –20°С, после чего образцы центрифугировали 12 мин при 12000 g (4°С). Осадки промывали 80% этанолом, высушивали и растворяли ДНК в 200 мкл воды (MilliQ). ДНК хранили при –20°С до использования.

Исследование генетического материала родительских особей и их потомков проводилось методом микросателлитного анализа. Было использовано четыре микросателлитных несцепленных между собой локуса – An20, AfuG41, AoxD161, AoxD165 (Zane et al., 2002; Welsh et al., 2003; Henderson-Arzapalo, King, 2002) (табл. 1).

Таблица 1. Локусы и праймеры для микросателлитного анализа

Локус	Праймеры 5'-3'
An20	F: AATAACAATCATTACATGAGGCT R: TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT
AfuG41	F: TGACGCACAGTAGTATTATTTATG R: TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC
AoxD161	F: GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC R: TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC
AoxD165	F: TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC R: AAAGCCCTACAACAAATGTCAC

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 15 мкл в реакционной смеси, содержащей 1.5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, 0.6 мкл 50 мМ $MgCl_2$, по 0.6 мкл 2.5 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), по 0.6 мкл каждого праймера в стоковой концентрации 10 пм/мкл, 50 нг ДНК-матрицы и 1 ед. Taq-полимеразы.

ПЦР осуществляли в приборе PTC-225 “MJ Research” при следующих параметрах: предварительная денатурация ДНК – 5 мин при 95°С; синтез ПЦР-продуктов (35 циклов): плавление – 95°С – 20 сек, отжиг праймеров (52–56°С) – 15 сек, синтез ДНК – 72°С – 15 сек, окончательная достройка цепей – 72°С – 10 мин.

После ПЦР к смеси добавляли 5 мкл 6-кратного буфера для нанесения (0.25% бромфенолового синего, 0.25% ксиленцианола и 30% глицерина), 8 мкл полученной смеси наносили на 6% ПААГ. После окончания электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 30 мин, а затем промывали в дистиллированной воде 30 мин. Гели сканировали на гель-сканере “Typhoon 8600” (“Molecular Dinamics”).

На основании анализа электрофореграмм по каждому из локусов были выявлены аллели, характерные для исследуемых особей.

Морфологический анализ

Из полученного андрогенетического потомства удалось вырастить до 15 мес возраста двух особей (рис. 1) – сибирского осетра (А1, получен с использованием нативной спермы) и андрогенетического гибрида сибирский осетр × русский осетр (А2, криоконсервированная сперма); в контрольном потомстве истинных гибридов сохранилось 4 особи, в потомстве материнского вида (сибирского осетра) – 3. Для оценки степени морфологического сходства андрогенетических гибридов с родительскими видами и их истинными гибридами использовали 7 краниологических индексов (табл. 2), для которых ранее

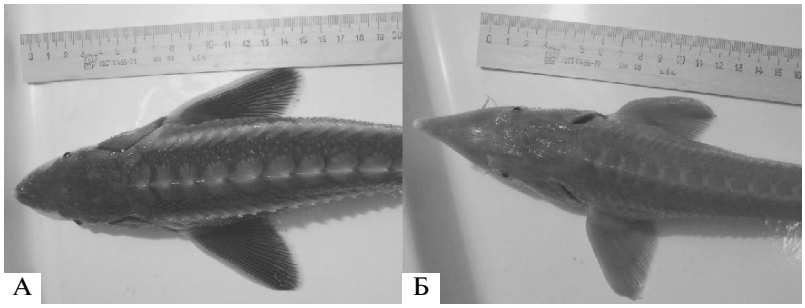

Рис. 1. Андрогенетический гибрид сибирский осетр *Acipenser baerii* × русский осетр *A. gueldenstaedtii*, полученный с использованием криоконсервированной спермы (А) и андрогенетический сибирский осетр (нативная сперма) (Б). Возраст рыб – 15 мес.

был выявлен высокий уровень дивергенции между сибирским и русским осетрами (Vasil'eva, 2004, 2009). Схема промеров, использовавшихся для получения этих индексов, была опубликована ранее (Васильева и др., 2001; Vasil'eva, 2004). Среди стандартных морфологических признаков, применяемых в систематике и популяционных исследованиях осетровых рыб (Берг, 1948; Holč ik, 1989; Gröger, Debus, 2000; Elvira, Almodo'var, 2000), были отобраны следующие: 1) форма жаберных тычинок, как основной диагностический признак сибирского осетра (Берг, 1948; Holčik, 1989; Vasil'eva, 1999); 2) число жучек в боковом и спинном рядах и число жаберных тычинок на первой жаберной дуге (табл. 3), по которым были выявлены различия в средних значениях между сибирским и русским осетрами по данным

Таблица 2. Краниологические характеристики 15-месячной молоди сибирского осетра (B), андрогенетического сибирского осетра (A1), андрогенетического ядерно-цитоплазматического (A2) и истинных гибридов (B × G) сибирского и русского осетров и 12-месячной молоди отцовского вида (G)

Формы Признаки	B ($n = 3$)	A1 ($n = 1$)	A2 ($n = 1$)	B × G ($n = 4$)	G ($n = 4$)
TL, мм	186–322 250.7	~336	~395	230–268.0 246.0	193–334 283.3
Ri/D	69.7–73.3 71.4	69.8	61.4	65.2–71.9 68.2	56.4–63.1 60.6
Mr/D	57.8–61.2 59.2	61.4	48.8	56.6–59.9 58.5	48.8–57.1 52.7
Fds/Ri	86.4–89.1 87.8	82.3	117.7	81.9–103.6 93.8	114.4–123.0 117.6
Pds/Ri	57.6–67.9 61.4	61.7	89.2	61.5–71.5 67.9	79.1–97.8 87.5
W/Ri	56.2–62.4 59.5	62.2	77.0	52.9–70.2 62.1	67.6–80.8 76.3
B/B_1	105.2–141.7 121.2	144.6	86.3	98.1–106.2 102.2	46.9–58.3 52.7
B/Ri	42.8–49.3 46.7	53.0	37.1	42.4–49.7 44.9	26.6–32.0 28.2

Обозначения промеров, использованных для получения индексов (в %): *Fds* – расстояние от переднего конца frontale до заднего края dermosupraoccipitale; *Ri* – расстояние от вершины рострума до заднего угла infraorbitale accessorium; *Pds* – расстояние от переднего конца parietale до заднего края dermosupraoccipitale; *D* – длина dermocranium от конца рострума до заднего края dermosupraoccipitale; *Mr* – длина участка дермокраниума, занимаемого комплексом костей rostralia-medialia; *W* – ширина дермокраниума на уровне заднего угла infraorbitale accessorium; *B* – расстояние от переднего конца рострума до основания внутренней пары усиков; B_1 – расстояние от основания усиков до ротового хряща; *TL* – общая длина тела рыбы; *n* – число особей.

Над чертой – пределы варьирования, под чертой – *M*.

Таблица 3. Морфометрические характеристики 15-месячной молоди сибирского осетра, андрогенетического сибирского осетра, андрогенетического ядерно-цитоплазматического и истинных гибридов сибирского и русского осетров и молоди отцовского вида

Формы Признаки	B ($n = 3$)	A1 ($n = 1$)	A2 ($n = 1$)	B × G ($n = 4$)	G ($n = 4$)	G-1 ($n = 3$)
TL, мм	186–322 250.7	~336	~395	230–268.0 246.0	193–334 283.3	377–440 418.0
Lsc	40–50 44.0	46	38	34–43 37.5	32–35 33.8	31–36 34.3
Dsc	13–15 13.7	15	12	12–13 12.8	10–16 12.8	11–14 12.3
spbr	28–31 30.0	30	26	23–26 24.3	20–24 22.3	18–19 18.7
			В % длины головы			
a	49.5–51.0 45.5	49.1	40.9	46.2–51.5 48.7	38.7–43.2 40.5	33.9–35.7 34.7
aB	28.5–33.0 30.9	33.1	20.7	26.9–32.5 28.6	14.4–18.7 16.1	13.3–14.2 13.8
wM	28.1–30.2 29.3	28.2	28.0	26.9–28.8 27.8	28.4–40.4 32.7	27.7–32.8 29.8
lB	18.4–27.6 22.5	22.5	24.0	15.4–21.6 18.8	15.3–19.7 17.4	14.0–20.8 18.1
o	8.6–12.1 10.0	7.9	8.8	10.9–12.5 11.8	10.9–16.3 13.1	11.6–12.6 12.1
io	27.5–30.4 28.9	29.2	33.9	28.9–30.2 29.5	29.3–34.7 29.5	29.8–33.7 31.6
hc	35.6–38.2 37.2	40.1	52.2	36.6–40.7 38.4	44.4–54.9 48.8	50.0–57.6 52.7

Примечание. G-1 – крупные экземпляры русского осетра, обозначения остальных форм как в табл. 2. Обозначения признаков: *TL* – общая длина тела, *Lsl* – число жучек бокового ряда слева; *Dsc* – число жучек спинного ряда; *spbr* – число жаберных тычинок; *a* – длина рыла, *aB* – расстояние от конца рыла до усиков, *wM* – ширина рта, *lB* – длина наружного (самого длинного) усика, *o* – горизонтальный диаметр глаза, *io* – межглазничное расстояние, *hc* – высота головы у затылка (перед первой спинной жучкой); *n* – число экземпляров.

литературы (Берг, 1948; Holčik, 1989); 3) семь морфометрических признаков (табл. 3), ранее обнаруживших наибольшую разрешающую способность для разделения выборок этих видов (Vasil'eva, 2004; Birstein et al., 2005).

Поскольку из-за отсутствия яйцеклеток сибирского осетра обычное потомство этого вида в данном исследовании получено не было, для сравнительного анализа использовали данные по 12-месячной молоди из экспериментальных исследований 1999 г. (Васильева и др., 2001); несколько экземпляров рыб старшего возраста и больших размеров (табл. 3) из коллекции Зоологического музея МГУ использовали для выяснения характера размерной изменчивости характеристик, применявшихся в сравнительном морфологическом анализе. Количество изученного материала представлено в табл. 2, 3. По всем признакам рассчитывали среднее значение в выборках родительских видов и истинных гибридов. Для сравнительной оценки степени сходства гибридных форм с родительскими видами определяли гибридный индекс по формуле, предложенной Веригиным и Макеевой (Веригин, Макеева, 1972): $HI = [100(M_h - M_f)/(M_m - M_f) - 50] \times 2$, где M_h – среднее значение признака у гибридной формы (в случае андрогенетических особей – индивидуальное значение признака), M_f – среднее его значение у материнского вида, M_m – у отцовского. При отрицательных значениях индекса гибридные особи уклоняются в сторону материнского вида, при положительных – в сторону отцовского.

Таблица 4. Результаты опыта (число и % выживших экземпляров на разных стадиях развития) по получению диспермного андрогенеза у сибирского осетра с использованием криоконсервированной спермы

Вариант	Гаструла		Нейрула		Нормальные личинки			Мальки (2 мес)	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	% нейр	% гастр	Шт.	%
Криоконсервированная сперма:									
КГ	69	23.3	24	34.8	0	0.0	0.0	0	0.0
АД	153	23.5	18	11.8	6	33.3	3.9	4	66.7
КД	127	38.5	120	94.5	113	94.2	89.0	71	62.8
Нативная сперма:									
КГ	146	45.6	63	43.2	0	0.0	0.0	0	0.0
АД	175	44.9	46	26.3	15	32.6	8.6	9	60.0
КД	181	81.2	167	92.3	156	93.4	86.2	103	66.0

Примечания. АД – диплоидный андрогенез (зародышей подвергали тепловому шоку 37°С, 2.0 мин). КГ – контроль гаплоидный (андрогенетических зародышей тепловому шоку не подвергали). КД – контроль диплоидный (использовали необлученные яйцеклетки).

Определение половой принадлежности андрогенетических особей

Из выращенных до 15 мес возраста рыб (см. раздел *Морфологический анализ*) в исследовании по определению пола были использованы две андрогенетические особи (А1 и А2) и по две особи из контрольных потомств сибирского осетра и истинных гибридов сибирского и русского осетров. После вскрытия рыб (применяли анестетик MS-222), гонады были извлечены и исследованы вначале макроскопически, а затем с помощью гистологического анализа. Яичники идентифицировали по наличию характерной борозды, разделяющей гонаду на две лопасти, и уплощенной форме, семенники – по однолопастной структуре (борозда отсутствует) и треугольной или округлой в сечении форме.

Далее для гистологического анализа гонады фиксировали в жидкости Буэна. Препараты готовили по традиционной методике (Ромейс, 1953). Использовали проводку по спиртам повышающейся крепости и смесям этилового спирта с бутанолом. Поперечные срезы гонад толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином по Эрлиху с докраской эозином. Анализ и фотографирование препаратов проводили с помощью системы BIOSONIC (микроскоп Leica DMLS с насадкой – автоматической видеокамерой Leica DC100, персональный компьютер Intel, специальное программное обеспечение для обработки видеоизображений DC Viewer, ImageJ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов по получению андрогенетических потомств с использованием криоконсервированной спермы

1. Получение андрогенетического потомства сибирского осетра

В параллельных вариантах опыта использовали свежезамороженную и нативную сперму, полученную от одних и тех же самцов сибирского осетра. Нативной и размороженной спермой осеменяли облученную икру от трех самок сибирского осетра. Опыт был проведен в 2006 г. в самом конце нерестовой кампании, что, по-видимому, обусловило низкое качество спермы. После оттаивания замороженных спермиев их подвижность составила только 25%.

Результаты опыта представлены в таблице 4. Процент живых эмбрионов на стадии гаструлы отражает успешность осеменения и выживаемость эмбрионов после шока. Из таблицы видно, что в данном опыте гибели эмбрионов после шока практически не наблюдалось (доли живых эмбрионов на стадии гаструлы в вариантах КГ и АД одинаковы). Такая картина, типичная при использовании яйцеклеток диких рыб, при использовании самок, содержащихся в условиях искусственного выращивания, наблюдалась нами впервые.

Применение теплового шока приводило к получению нормальных жизнеспособных личинок как в вариантах с использованием нативной, так и криоконсервированной спермы сибирского осетра (см. табл. 4). В вариантах же без тепловой обработки бы-

Таблица 5. Результаты опыта (число и % выживших экземпляров на разных стадиях развития) по получению андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами с использованием криоконсервированной спермы

Вариант	Гаструла		Обособл. хвоста		Нормальные личинки		Мальки 2 мес	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%
Криоконсервированная сперма:								
КГ	108	77.7	78	72.2	0	0.0	0	0.0
АД	230	13.1	180	78.3	34	14.8	10	29.4
КД	36	13.9	36	100.0	36	100.0	36	100
Нативная сперма:								
КГ	57	45.6	41	71.9	0	0.0	0	0.0
АД	99	12.2	86	86.9	11	11.1	4	36.4
КД	40	10.7	36	90.0	33	82.5	33	100

Сокращения как в табл. 4.

ли получены нежизнеспособные гаплоидные зародыши и предличинки. Таким образом, нами был получен диспермный андрогенез у сибирского осетра, в том числе, впервые с использованием криоконсервированной спермы.

В данном опыте криоконсервация спермы приводила к снижению выживаемости гаплоидных и диплоидных андрогенетических эмбрионов на ранних стадиях (до нейрулы). Однако в дальнейшем выживаемость андрогенетических эмбрионов и личинок, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы, была сходной. Выживаемость же контрольных зародышей (КД), развивавшихся из замороженной и нативной спермы, в данном опыте была одинаковой. В 2007 г. был проведен аналогичный опыт на сибирском осетре, в котором были получены сходные результаты.

2. Получение андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами

При проведении опыта мы располагали яйцеклетками сибирского осетра и замороженной спермой русского осетра и нативной спермой сибирского осетра. Таким образом, сопоставление выживаемости эмбрионов в вариантах с замороженной и нативной спермой в данном опыте можно проводить с определенной степенью условности. Результаты опыта представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы, выживаемость гаплоидных и диплоидных андрогенетических эмбрионов, а также личинок и мальков в вариантах с замороженной и нативной спермой была приблизительно одинаковой. Таким образом, отрицательного влияния криоконсервации спермы на выживаемость андрогенетического потомства в данном случае не наблюдалось.

Микросателлитный анализ

Микросателлитный анализ, выполненный на материале опыта 2007 г. на сибирском осетре, выявил неожиданный результат. Хотя для получения андрогенетического потомства в этом опыте была использована смесь спермы трех самцов (рабочие номера 2, 4 и 6), анализ микросателлитных локусов Afug 41 и An20 показал, что оплодотворяли яйцеклетки только спермии самца № 6 (табл. 6). Тем не менее, полученные в этом опыте андрогенетические потомства оказались вполне жизнеспособны как при использовании нативной, так и криоконсервированной спермы (см. результаты выше).

Сходный аллельный состав по локусам Afug 41 и An20 у самки и самца № 6 не позволил сделать заключение о полноте генетической инактивации яйцеклеток в данном опыте. Однако анализ по другому локусу, AoxD161, подтвердил отсутствие материнских аллелей у андрогенетических потомков (рис. 2). Как видно из рисунка, в геноме у опытных особей присутствуют только аллели, характерные для самца, в то время как у контрольного потомства присутствуют как отцовские, так и материнские аллели.

Также был проведен анализ микросателлитной ДНК андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами, полученных с использованием криконсервированной спермы (возраст рыб – 3 мес). В соответствии с результатами этого анализа 3 из 8 андрогенетических гибридов оказались гетерозиготными хотя бы по одному из исследованных микросателлитных локусов AfuG41 и AoxD165 (рис. 3). В контрольном потомстве гетерозиготными по тем же локусам оказались 7 из 11 изученных особей (данные анализа не приводятся).

Морфологический анализ

По всем использовавшимся в анализе краниологическим индексам выборки одноразмерных особей родительских видов различались с хиатусом. Значения этих признаков у андрогенетического ядерно-цитоплазматического гибрида (А2) в большинстве случаев укладывались в диапазон изменчивости потомства отцовского вида, и только по двум индек-

Таблица 6. Аллельный состав (выражен в числовых эквивалентах) локусов Afug 41 и An20 у родителей, в контрольном и андрогенетическом потомстве сибирского осетра

Название образца	Afug 41						An20				
самка	193	209	213					155	159		167
самец 2	193		213		245	249	147	155	159		
самец 4	193				245				159		
самец 6	193	209		225					159	163	167
контр.н.1		209	213	225				155	159		167
контр.н.2	193	209		225					159		167
контр.н.3	193	209		225					159		167
контр.н.4	193	209	213	225					159		167
контр.н.5	193	209		225					159		167
контр.н.6		209	213	225				155	159		167
контр.к.1	193	209	213					155	159		167
контр.к.2	193	209							159		167
контр.к.3	193	209	213						159		167
контр.к.4		209	213	225					159		167
контр.к.5	193	209		225				155	159		
андрог.н.1	193	209							159		167
андрог.н.2		209		225					159		
андрог.н.3	193	209							159		167
андрог.н.4		209		225					159		167
андрог.к.1	193	209							159		167
андрог.к.2		209		225					159		167

Сокращения: н. – нативная сперма; к. – криоконсервированная сперма.

сам, определяющим положение усиков (B/B_1, B/Ri), наблюдалось небольшое смещение значений в сторону материнского вида (табл. 2). Рассчитанные гибридные индексы во всех случаях демонстрировали сходство с отцовским видом – русским осетром (табл. 7). В то же время андрогенетический сибирский осетр (А1) обнаруживал наибольшее сходство с контрольной молодью сибирского осетра, а у истинных гибридов сибирского осетра с русским наблюдалась матроклиния или промежуточное наследование краниологических индексов (табл. 2, 7).

По форме жаберных тычинок андрогенетический гибрид А2 (рис. 4б) был неотличим от русского осетра (рис. 4в), имея простые утолщенные жаберные тычинки, а не так называемые "веерообразные", как у материнского вида (рис. 3а) или андрогенетического сибирского осетра А1. Простые, не "веерообразные" жаберные тычинки имели также и истинные гибриды, по-видимому, эта форма соответствует доминантному состоянию признака.

Среди 10 изученных морфометрических признаков хиатус между значениями в потомствах родительских видов наблюдался лишь в пяти случаях (*Lsc*, *spbr*, *a*, *aB*, *hc*), а остальные признаки обнаруживали ту или иную степень перекрывания (табл. 3). Андрогенетический ядерно-цитоплазматический гибрид (А2) по всем упомянутым пяти признакам был сходен с отцовским видом, а андрогенетический сибирский осетр (А1) – с сибирским осетром; истинные гибриды характеризовались промежуточным наследованием со сдвигом либо в сторону отцовского (*Lsc, spbr*), либо материнского (*a*, *aB*, *hc*) видов (табл. 3, 8). Аналогичная ситуация наблюдалась и по двум признакам (*Dsc*, *io*), обнаруживающим перекрывание в потомствах сибирского и русского осетров (табл. 3, 8). Среди остальных морфометрических характеристик по относительной ширине рта (*wM*) андрогенетический гибрид А2 и истинные гибриды были сходны с материнским видом и, соответственно, андрогенетическим сибирским осетром, а по длине наружных (самых длинных) усиков (*lB*) и величине горизонтального диаметра глаза (*o*) андрогенетический гибрид А2 был сходен с материнским видом и андрогенетическим сибирским осетром, тогда как истинные гибриды уклонялись в сторону отцовского вида (табл. 3, 8).

Сравнительный анализ крупных и мелких особей из потомства русского осетра показал, что большинство анализируемых морфометрических признаков обнаруживают значительную размерную изменчивость; к числу признаков, не подверженных размерной изменчивости, можно отнести лишь три характеристики: *Lsc*, *Dsc*, *io*. Выявленное на основе рассчитанного гибридного индекса большее сходство

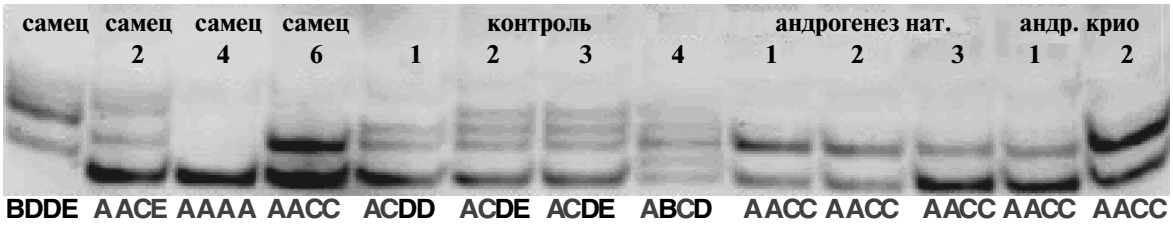

Рис. 2. Наследование материнских и отцовских аллелей локуса AoxD161 в контрольном и андрогенетическом потомстве сибирского осетра *Acipenser baerii*.

Примечание. Латинские буквы A, B, C, D, E соответствуют аллелям различного размера.

андрогенетического гибрида А2 с сибирским осетром по относительной ширине рта (*wM*) следует считать следствием размерной изменчивости данного признака у русского осетра (уменьшается по мере роста) и более крупными размерами особи А2 в сравнении с 12-месячным потомством русского осетра (табл. 3). Этот вывод соответствует данным Бирштейна с соавторами (Birstein et al., 2005), получившими "высокое дифференцирующее значение" относительной ширины рта на выборках сибирского и русского осетров, отличающихся по средней длине тела. В то же время, в противоположность ситуации с относительной шириной рта, большее сходство андрогенетического гибрида А2 с потомством сибирского осетра по относительной длине усиков и диаметру глаза, несмотря на размерную изменчивость этих характеристик, не могут быть объяснены лишь различиями в размерах особей разного происхождения. Совершенно очевидно, что в этих случаях у андрогенетического гибрида А2 наблюдается матроклиния, не выраженная у истинных 15-месячных гибридов сибирского и русского осетров.

Определение половой принадлежности андрогенетических особей

Уже макроскопический анализ при вскрытии позволил определить пол у всех рыб. Обе контрольные особи сибирского осетра оказались самками. Среди контрольных истинных гибридов сибирский осетр × русский осетр одна особь оказалась самкой, а другая – самцом. Из андрогенетических рыб особь А1 была идентифицирована как самка, а А2 – как самец. Последующий гистологический анализ подтвердил эти данные (рис. 5).

Изучение гистологических препаратов показало, что гонада андрогенетической самки А1 развивалась неравномерно. В некоторых участках гонады присутствовали группы ("гнезда") оогоний в процессе перехода к ооцитам (стадии прелептонемы и лептонемы). В этих участках гонады практически отсутствовала жировая ткань. Однако достаточно большая часть гонады четко подразделялась на жировую и генеративно-соматическую ткань. В центре генеративно-соматической части наблюдались обособленные группы клеток вытянутой формы с овальными ядрами, окруженные соединительнотканными септами. Среди этих клеток встречались недифференцированные гонии и единично первичные половые клетки.

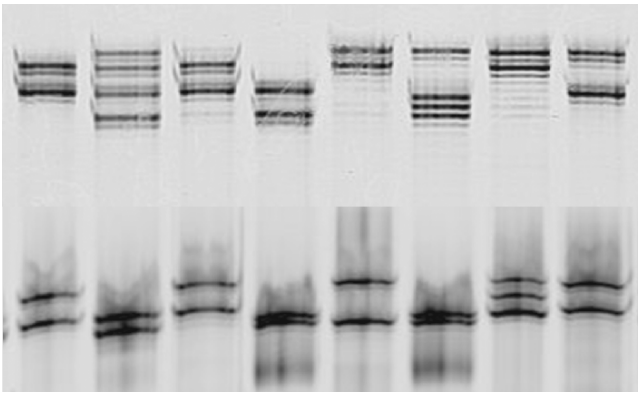

Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации по локусам AfuG41 (вверху) и AoxD165 (внизу) у андрогенетических гибридов между сибирским *Acipenser baerii* и русским *A. gueldenstaedtii* осетрами.
Гетерозиготы имеют три или четыре полосы.

В яичниках у двух контрольных самок (одна самка из потомства сибирского осетра и одна – гибридная самка) были полностью сформированы яйценосные пластинки и присутствовали ооциты периода протоплазматического роста. В гонадах третьей контрольной самки (сибирский осетр), значительно отставшей в развитии, гаметогенез только начался, гонии находились в процессе активного митотического деления и еще не были дифференцированы в оогонии.

Андрогенетический гибрид сибирского и русского осетров (А2) имел гонаду, развивающуюся по типу семенника. В гонаде присутствовало много жировой ткани, были хорошо развиты кровеносные сосуды, гонии интенсивно митотически размножались. Наблюдалось распространение гоний с периферической (герминативный эпителий) в центральную часть гонады, также были видны обособленные скопления гоний, свидетельствующие о формировании семенных ампул. Гонада самца из контрольного варианта опыта (обычный гибрид сибирского и русского осетров) характеризовалась теми же особенностями развития.

Таким образом, проведенный гистологический анализ позволяет сделать заключение о том, что раз-

Таблица 7. Гибридные индексы (HI) краниологических характеристик у экспериментальной молоди осетровых

Признаки Формы	*Ri/D*	*Mr/D*	*Fds/Ri*	*Pds/Ri*	*W/Ri*	B/B_1	*B/Ri*
A2	85.2	220.0	100.7	240.0	108.3	1.90	3.78
A1	−70.4	−167.7	−136.9	−97.7	−67.9	−168.3	−168.1
B × G	−40.7	−78.5	−59.7	−50.2	−69.1	−94.5	−80.5

Примечание. Обозначения форм и признаков как в табл. 2.

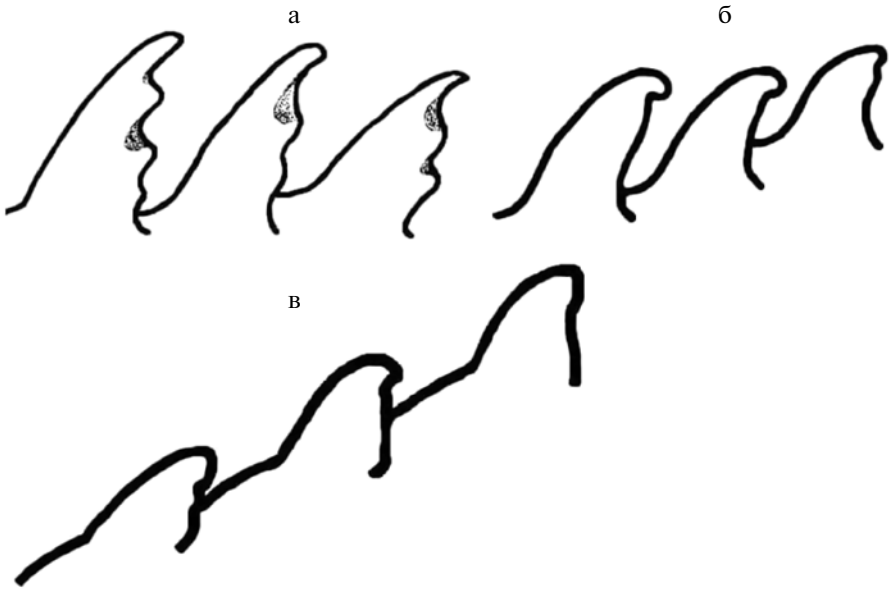

Рис. 4. Строение жаберных тычинок у сибирского осетра (а), андрогенетического гибрида сибирского и русского осетров (б) и русского осетра (в).

витие гонад у андрогенетических осетров протекало нормально.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, в настоящем исследовании впервые с использованием криоконсервированной спермы получены андрогенетическое потомство сибирского осетра и андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды у осетровых рыб. Ранее успех в этом направлении исследований был достигнут нами на севрюге (*A. stellatus*) (Grunina et. al., 2006).

Полученные в настоящем исследовании с использованием яйцеклеток сибирского осетра и глубокозамороженной спермы русского осетра (срок хранения спермы – 2 года) андрогенетические гибриды оказались полностью жизнеспособны. Результаты этого исследования указывают на возможность восстановления исчезающих видов осетровых рыб с помощью андрогенеза, в случае, если сохранилась исключительно их криоконсервированная сперма. Ранее, с использованием нативной спермы, нами были получены андрогенетические гибриды между русским и сибирским осетрами, которые также были жизнеспособны. Однако не всегда андрогенетические гибриды от реципрокных скрещиваний жизнеспособны в равной степени (Грунина, Рекубратский, 2005).

Жизнеспособность полученных в данном исследовании андрогенетических потомств обусловлена использованием для их получения метода диспермного андрогенеза, обеспечивающего гетерозиготность андрогенетических особей. Следует отметить, что полученные с помощью диспермного андрогенеза с использованием спермы от одного самца сибирского осетра (см. результаты) и возникшие в результате слияния ядер его спермиев андрогенетические потомства (коэффициент инбридинга – 0.5, как при самооплодотворении) также демонстрировали нормальную выживаемость. При альтернативном способе индукции диплоидного андрогенеза – за счет блокирования первого деления дробления (митотический андрогенез), андрогенетические особи у осетровых рыб нежизнеспособны из-за их повышенной чувствительности к возникающей при этом полной гомозиготности (коэффициент инбридинга равен 1).

Таблица 8. Гибридные индексы (HI) морфометрических характеристик у экспериментальной молоди осетровых

Признаки Формы	*Lsc*	*Dsc*	*spbr*	*a*	*aB*	*wM*	*lB*	*o*	*io*	*hc*
A2	17.7	277.7	3.9	84.4	37.8	−176.5	−158.8	−177.4	222.6	158.6
A1	−139.2	−388.9	−100.0	−244.0	−129.7	−164.7	−100.0	−235.5	−80.7	−50.0
B × G	27.5	−100.0	48.1	−228.0	−68.9	−188.2	45.1	16.1	−61.3	−79.3

Примечание. Обозначения форм и признаков как в табл. 3.

Наблюдаемая нами в опыте на сибирском осетре пониженная выживаемость андрогенетических потомств на ранних стадиях при использовании криоконсервированной спермы, по всей видимости, связана с возникновением в спермиях доминантных и/или рецессивных леталей вследствие заморозки. Однако эти мутации реализовались до стадии нейрулы и в дальнейшем выживаемость андрогенетических эмбрионов и личинок, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы была сходной. Таким образом, использование метода андрогенеза в данном опыте позволило выявить повреждения, возникающие в спермиях при замораживании и оттаивании. На уровне обычного скрещивания эти повреждения не проявлялись (см. результаты в КД), поскольку компенсировались работой второго (материнского) генома. В опыте же по получению андрогенетических гибридов процессы замораживания и оттаивания не привнесли существенных повреждений в наследственный аппарат спермиев, на что указывает сходная выживаемость андрогенетических эмбрионов, полученных из нативной и криконсервированной спермы (см. результаты).

В данном исследовании нам впервые удалось с помощью анализа микросателлитной ДНК подтвердить чисто отцовскую наследственность андрогенетического потомства осетровых рыб. У особей в потомстве сибирского осетра, полученного с помощью диспермного андрогенеза, отсутствовали материнские аллели по одному из исследованных локусов (AoxD161), что указывает на инактивацию женского ядра. Кроме того, среди полученных андрогенетических гибридов были выявлены гетерозиготы по некоторым локусам (AfuG41 и AoxD165), что подтверждает диспермную природу андрогенеза. Ранее диспермный характер андрогенеза у осетровых рыб был доказан нами с помощью RAPD-PCR анализа андрогенетических особей, при получении которых использовали смесь спермы разных видов (Грунина, Рекубратский, 2005).

Для идентификации андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов между сибирским и русским осетрами в данном исследовании успешно использовался сравнительный морфологический анализ. По всем краниологическим индексам и большинству морфометрических характеристик 15-месячный андрогенетический ядерно-цитоплазматический гибрид А2 обнаруживал полное морфологическое сходство с отцовским видом, отличаясь даже визуально от одновозрастной молоди материнского вида, истинных гибридов и андрогенетической особи сибирского осетра А1 (см. рис. 1). На основании этих данных можно сделать вывод о полной инактивации материнского генома у данной особи и подтверждении правильности ее определения как андрогенетического ядерно-цитоплазматического гибрида. Этому выводу не противоречат данные по выявленной матроклинии в случае двух

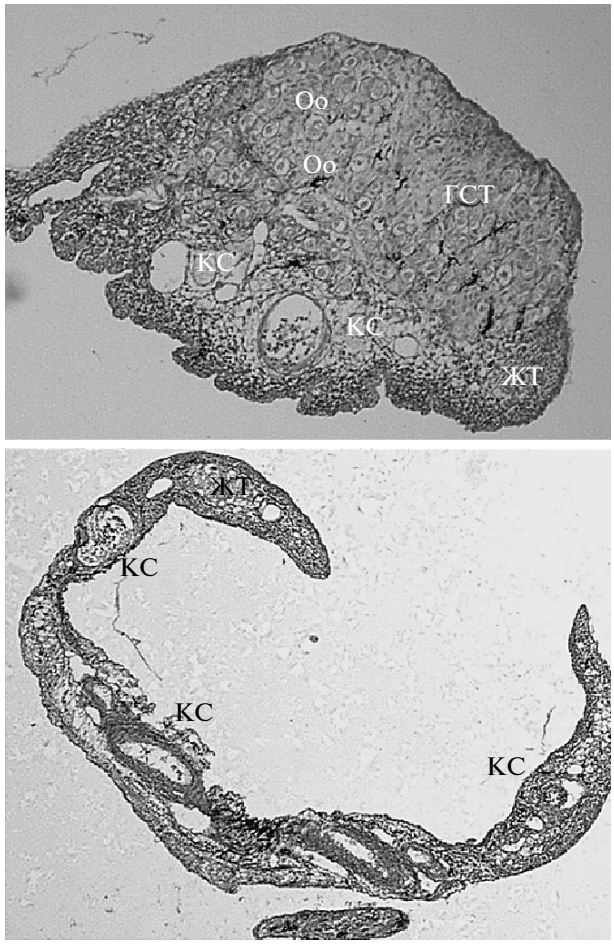

Рис. 5. Гонада особей А1 (вверху) и А2 (внизу).
Оо – оогонии, ЖТ – жировая ткань, ГСТ – генеративно-соматическая ткань, КС – кровеносные сосуды. Увеличение ×10.

морфометрических характеристик: длина усиков и диаметр глаза.

Ранее у разных вариантов андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов было выявлено проявление матроклинии по отдельным признакам, формирующимся в постларвальном онтогенезе, вплоть до возраста 1 года или даже трех лет (Васильева и др., 2001, 2005). При этом в случае андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов персидского *Acipenser persicus* и русского осетров, как и в данном случае с андрогенетическим гибридом сибирского и русского осетров, была выявлена задержка в становлении отцовских признаков у андрогенетических гибридов по сравнению с гибридами истинными, что объяснялось как следствие проявления несовместимости между чужеродным ядром и цитоплазмой (Васильева и др., 2001). Этот феномен не был выявлен в случае андрогенетических гибридов севрюги *A. stellatus* и белуги *A. huso* (Васильева и др., 2005), которые, согласно современным генетическим данным, являются достаточно близкими видами, но, очевидно, не более

близкородственными, чем сибирский и русский осетры (Ludwig et al., 2001; Robles et al., 2004; Krieger et al., 2008). Вполне возможно, что феномен задержки становления отцовского состояния некоторых морфологических признаков у андрогенетических гибридов, полученных с использованием спермы русского осетра, связан с особенностями постларвального онтогенеза этого вида.

В данном исследовании впервые определена половая принадлежность у выращенных андрогенетических осетров. Две исследованных особи – андрогенетический сибирский осетр и андрогенетический гибрид между сибирским и русским осетрами были идентифицированы соответственно как самка и самец. Полученное нами гиногенетическое потомство сибирского осетра также включало как самок, так и самцов (неопубликованные данные). Это свидетельствует о том, что для этих видов характерен одновременно и мужской и женский тип гетерогаметности. Полученные данные не противоречат современным представлениям о механизмах определения пола у тетраплоидных видов осетровых рыб (Vasil'eva et. al., 2009), к которым принадлежат и исследованные нами рыбы (Васильев, 1985). Несмотря на малое количество исследованных особей, обнаружение самки в андрогенетическом потомстве заслуживает особого внимания в связи с проблемой регуляции пола у осетровых рыб и возможностью получения с помощью андрогенеза бисексуального потомства.

В целом, результаты настоящей работы подтверждают возможность применения метода дисперного андрогенеза в сочетании с использованием криоконсервированной спермы для воссоздания генофондов исчезающих популяций и видов осетровых рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 301 с.

Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 1. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 466 с.

Васильева Е.Д., Грунина А.С., Рекубратский А.В. Характер проявления некоторых морфологических признаков у андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов персидского *Acipenser persicus* и русского *A. gueldenstaedtii* осетров в постларвальном онтогенезе // Вопросы ихтиологии. 2001. Т. 41. № 4. С. 530–537.

Васильева Е.Д., Грунина А.С., Рекубратский А.В., Павлинов И.Я. Характер проявления некоторых морфологических признаков у андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов севрюги (*Acipenser stellatus*) и белуги (*Huso huso*) (Acipenseridae) в постларвальном онтогенезе // Вопросы ихтиологии. 2005. Т. 45. № 4. С. 525–538.

Веригин Б.В., Макеева А.П. Гибридизация карпа с пестрым толстолобиком // Генетика. 1972. Т. 8. № 7. С. 55–64.

Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М.: Наука, 1968. 357 с.

Грунина А.С., Гомельский Б.И., Нейфах А.А. Диплоидный андрогенез у карпа // Генетика. 1990. Т. 26. №. 11. С. 2037–2043.

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 // Там же. 2005. Т. 36. № 4. С. 254–264.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностр. Литература, 1953. 719 с.

Birstein, V.J., Bemis, W.E., Waldman, J.R. The threatened status of acipenseriform fishes: a summary. In: Sturgeon Biodiversity and Conservation. Eds: Birstein, V.J., Waldman, J.R., Bemis, W.E., Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. pp. 427–444.

BirsteinV.J., Ruban G.I., Ludwig A., Doukakis P., DeSalle R. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: how many cryptic forms does it contain? // Systematics and Biodiversity 2005. V. 3. № 2. P. 203–218.

Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // Nucleic Acids Res. 1976, September; V. 3. № 9. P. 2303–2308.

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.

Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 300 p.

Elvira B., Almodovar A. Morphology and taxonomy of the Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio* from Spain // Folia Zoologica. 2000. V. 49. P. 221–230.

Gröger J., Debus L. Morphometric comparison of *Acipenser sturio* L. populations based on mixed estimation and morphometric measurements // Arch. Fish Mar. Res. 2000. V. 48. № 2. P. 175–193.

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 // The 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., Vasil'eva E.D., Chebanov M.S. Dispermic androgenesis as a method for recovery of endangered sturgeon species // 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-Rejo'n M. (eds.). Netherlands: Springer. 2009. P. 191–208.

Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol. Ecol. Notes. 2002. № 2. pp. 437–439.

Holčik J. (editor) 1989. The Freshwater Fishes of Europe. 1. Pt. 2. Wiesbaden: AULA-Verlag. 469 p.

Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A., Artyukhin E., Ludwig A. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24 (Supplement 1). P. 36–45.

Ludwig A., Belfiore N., Pitra C. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // Genetics. 2001. V. 158. P. 1203–1215.

Penman D.J., Myers J.M., McAndrew B.J. Restoration of diploid genotypes by androgenesis // Proc. Conf. "Refrigeration and Aquaculture". Bordeaux, 20–22 March. 1996. P. 469–474.

Recoubratsky A.V., Grunina A.S., Minin A.A. et al. Dispermic androgenesis in *Acipenser stellatus* // Sturgeon Quart. 1996. V. 4. N.4. P. 12–14.

Suquet M., Dreanno C., Fauvel C. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish // Aquaculture Res. 2000. V. 31. P. 231–243.

Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O., Billard R. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeon, *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus* // Journal Applied Ichthyology. 1996. V. 12. P. 407–412.

Robles F., de la Herrán R., Ludwig A., Rejón G.R., Rejón M.R., Garrido-Ramos M.A. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes // Gene. 2004. 338. P. 133–142.

Vasil'eva E.D. Some morphological characteristics of Acipenserid fishes: considerations of their variability and utility in taxonomy // J. Appl. Ichthyol. 1999. V. 15 (4–5). Proceedings of the 3rd Internat. Symposium on Sturgeon. Piacenza, Italy, July 8–11/1997. P. 32–34.

Vasil'eva E.D. Morphological data corroborating the assumption of independent origins within octoploid sturgeon species // J. Ichthyology. 2004. V. 44. Suppl. 1. P. 63–72.

Vasil'eva E.D. Morphological and morphometric characters in sturgeon taxonomy and phylogeny // 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-Rejo'n M. (eds.). Netherlands: Springer. 2009. P. 51–61.

Vasileva E.D., Grunina A.S., Recoubratsky A.V., Barmintsev V.A., Barmintseva A.E., Volkov A.A., Badrtdinov O.A., Kovalev K.V., Chebanov M.S., Vasilev V.P. Genetic mechanisms of sex determination in sturgeons. Problems and perspectives // 6th International Symposium on Sturgeon, October 25–31, 2009 Wuhan, Hubei Province, China. Harmonizing the relationships between Human Activities and Nature: the Case of Sturgeons. Book of Abstracts. Oral Presentation. Wuhan. P. 86–88.

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. № 3. pp. 47–55.

Zane L., Patarnello T., Ludwig A., Fontana F., Congiu L. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecol. Notes. 2002. № 2. pp. 586–588.

Dispermic Androgenesis in Sturgeons with the Help of Cryopreserved Sperm: Production of Androgenetic Hybrids between Siberian and Russian Sturgeons

A. S. Grunina[a], A. V. Rekubratsky[b], L. I. Tsvetkova[b], A. E. Barmintseva[c], E. D. Vasil'eva[d], K. V. Kovalev[b], and O. G. Polyektova[c]

[a] *Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*
e-mail: asgrunina@gmail.com

[b] *All-Russia Institute of Freshwater Fisheries, Rybnoe, Moscow oblast, 141821 Russia*

[c] *All-Russia Institute of Fisheries and Oceanography, ul. Verkhnyaya Krasnosel'skaya 17, Moscow, 107140 Russia*

[d] *Zoological Museum, Moscow State University, ul. Bol'shaya Nikitskaya 6, Moscow, 125009 Russia*

Abstract—Dispermic androgenesis was used to produce, for the first time, an androgenetic progeny of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and the androgenetic nuclear cytoplasmic hybrids (Siberian sturgeon, *A. baerii* × Russian sturgeon, *A. gueldenstaedtii*) using cryopreserved sperm. Microsatellite DNA analysis confirmed exclusively paternal inheritance in the androgenetic progeny of Siberian sturgeon. Heterozygotes for certain microsatellite loci were detected among the androgenetic hybrids, thereby confirming a dispermic nature of androgenesis. According to the data of comparative morphological analysis, the obtained androgenetic hybrid, by the age of 15 months old, was completely identical to the paternal species. Both a female and a male were detected in the androgenetic sturgeon progenies, which is of interest for producing bisexual progenies via androgenesis. The data of this study confirm the feasibility of dispermic androgenesis using cryopreserved sperm to preserve and recover the gene pools of endangered sturgeon species.

Keywords: dispermic androgenesis, sturgeons, cryopreserved sperm, microsatellite analysis, heterozygosity, androgenetic nuclear cytoplasmic hybrids, comparative morphological analysis, sex determination, histological analysis