ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

Государственный научный центр Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии»

Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»
(«ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга»)

«РЫБОХОЗЯЙСТВЕННАЯ НАУКА. ИСТОРИЯ, СОВРЕМЕННОСТЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ»

Материалы конференции, посвященной 110-летию создания
«ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга»
г. Санкт-Петербург, 23-24 октября 2024 г.

Москва
Издательство ВНИРО
2024

УДК 574.5(082)

Р 93 Рыбохозяйственная наука. История, современность, перспективы
Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию Санкт-Петербургского филиала ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга»), г. Санкт-Петербург, 23-24 октября 2024 г. / отв. ред. К.В. Колончин [и др.]. М.: Изд-во ВНИРО, 2024. 500 с.

В сборнике представлены материалы Международной научно-практической конференции «Рыбохозяйственная наука. История, современность, перспективы», посвященной 110-летию Санкт-Петербургского филиала ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им Л.С. Берга»), которые отражают результаты исследования по основным направлениям гидробиологии: структура и функционирование водных экосистем, популяции и сообщества, биологические ресурсы морских и континентальных водоемов, биоразнообразие водных организмов и роль видов-вселенцев, симбиотические и паразитарные взаимоотношения в водных экосистемах, экология рыб, методы оценки антропогенной нагрузки и качества вод.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области гидробиологии, зоологии, экологии, ихтиологии, преподавателей, аспирантов и студентов.

Редакционная коллегия:
К.В. Колончин, д.э.н., доцент, ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»
М.В. Сытова, к.т.н., доцент, ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»
М.М. Мельник, к.б.н. Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»
Ю.А. Малинина, к.б.н., доцент, Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»

Рецензенты: В.А. Румянцев, академик РАН, СПбНЦ РАН
Н.Н. Филатов, член-корр. РАН, КарНЦ РАН
И.Н. Остроумова, д.б.н., проф., Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»

Научное издание
Издание зарегистрировано в Научной электронной библиотеке

© ФГБНУ «ВНИРО», 2024
К.В. Колончин, М.В. Сытова,
М.М. Мельник, Ю.А. Малинина

ISBN 978-5-85382-558-1

УДК 575

ДИАГНОСТИКА ПЛОИДНОСТИ СИГОВЫХ РЫБ

А.А. Лютиков[*], М.М. Вылка[*], В.И. Турилова[**], Т.К. Яковлева[**], Т.А. Филатова[*], В.В. Костюничев[*], В.А. Голотин[*]

[*] *Санкт-Петербургский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга»), г. Санкт-Петербург, golotin@bk.ru*
[**] *Институт Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург*

Аннотация: *диагностика плоидности является важной неотъемлемой частью научных исследований по изучению плоидности рыб и наукоёмких хозяйств по получению рыб-триплоидов для снижения издержек и повышения общей эффективности в аквакультуре. Статья демонстрирует основные способы диагностики полиплоидии как природной, так и индуцированной, в частности индуцированной триплоидии сиговых на примере Stenodus leucichthys nelma. Сиговые являются представителями холодолюбивых объектами пресноводной аквакультуры, эмбриональный период которых занимает до полугода. В этом случае важно провести диагностику на самых ранних этапах эмбриогенеза для своевременного прогнозирования желаемого результата.*
Ключевые слова: триплоидия, идентификация плоидности, хромосомный анализ, ядра клеток крови, световая микроскопия, проточная цитометрия, микросаттелиты

Первые успешные опыты по плоидным манипуляциям на хромосомах рыб, сравнение роста и полового созревания в сравнении с контрольными диплоидными рыбами были проведены в 40-50-х годах XX в. Как следствие, индуцированная триплоидизация стала гораздо более частой и распространена теперь на многие виды морских и пресноводных рыб (Maxime, 2008). Получение рыб-триплоидов особенно распространено в связи с тем, что триплоидизация является сравнительно дешёвой манипуляцией модификации генома для получения желаемых товарных характеристик в отличие от относительно более долгих и дорогих работ по выведению межвидовых гибридов и селекционных работ по выведению новых пород рыб.

Для получения триплоидов радужной форели, ближайшим описанным родственником сиговых, обычно используют тепловой шок (Гомельский и Грунина, 1988). К преимуществам этого метода можно, безусловно, отнести возможность проведения процедуры без специального оборудования, что значительно удешевляет процесс. Однако, при получении триплоидов с использованием термошока наблюдаются значительно большая смертность икры, в сравнении с таковой у контрольных диплоидов.

В последствие кроме термошока все чаще стали получать триплоиды с помощью гидростатического давления. По данным исследований (Haffray et al., 2007), смертность икры в процессе инкубации и доля уродливых экземпляров в потомстве, при применении этого метода, оказывались меньше.

Важнейшей методической частью по изучению природной и индуцированной полиплоидии является её своевременная и точная диагностика. В зависимости от потребностей исследования, наличия соответствующего лабораторного оснащения и квалификации персонала, существует несколько подходов к такой диагностике у рыб (рис.).

Самыми простыми являются методы визуальной оценки. Первый способ – цитоморфология на окрашенных мазках крови. Суть метода заключается в измерении диаметров эритроцитов и их ядер (Toth et al., 2005) в ручном визуальном или автоматическом режиме, используя различное программное обеспечение (Schneider et al., 2012), а затем полученные значения используют для расчета объемов клеток и их ядер (Soldatov et al., 2021). Полученные цитоморфологические данные сравниваются и проверяются методами статистики.

Второй визуальный метод основывается на подсчетах максимального количества ядрышек в ядрах эритроцитов на препаратах крови, окрашенных 50 % AgNO3 (Howell and Black, 2005). Площади ядер считают в графических редакторах. Соотношения объёмов клеток и их ядер коррелируют с их плоидностью. Была использована такая возможность для определения плоидности на поздних этапах эмбриогенеза на клетках крови нельмы (*S. leucichthys nelma)*, чира (*Coregonus nasus*), муксуна (*Coregonus muksun*) (рис., А) (Вылка и др., 2023).

Пожалуй, наиболее трудоёмким способом определения плоидности является подсчёт количества хромосом (рис., Б). Для такого анализа из различных тканей готовят хромосомные препараты, взятые на разных стадиях жизни рыб. Высокими митотическими активностями обладают эмбрионы рыб, а также пронефрос взрослых особей (Arai, 1984). Морфологию хромосом, а также подсчёт их количества осуществляется с помощью микроскопа во время клеточного деления – митоза, особенно в середине митоза на стадии метафазы, когда они максимально спирализованы (Кирпичников, 1987). Для того чтобы заблокировать деление хромосом на этой стадии, рыбам делают инъекцию или обрабатывают используемые для приготовления препаратов ткани химическими веществами (колхицин, колцемид (демеколцин), сульфат винбластин), которые предотвращают формирование нити веретена деления (Thorgaard et al., 1981). При отсутствии видовых особенностей количество хромосом кратно количеству гаплоидным хромосомным наборам. Так, было показано количественное отличие и подтверждение индуцированной триплоидии нельмы с использованием хромосомного анализа (рис., Б). Показано, что число хромосом в клетках диплоидной рыбы 76, включая 11 пар двуплечих хромосом. В клетках триплоидного животного обнаружено 114 хромосом, включая 33 двуплечие хромосомы.

Наиболее часто используемым способом анализа плоидности служит метод проточной цитофлуорометрии (рис., В), который позволяет достаточно точно и оперативно (при ранних этапах эмбриогенеза или у взрослых особей) оценить плоидность рыб, например, при индуцированной триплоидизации рыб (Thorgaard et al., 1982; Allen Jr. and Stanley, 1983; Лютиков и др., 2023). Материалом для проточного цитофлуориметра служат суспензии живых или фиксированных клеток, содержащих ядро и окрашенных флуоресцентными красителями, такими как DAPI или пропидий иодид, которые довольно специфично связываются с нуклеиновыми кислотами клетки (Riccardi and Nicoletti, 2006). Проточный цитометр способен анализировать огромное количество клеток за малый промежуток времени: размеры клеток и интенсивность их флуоресценции при окрашивании. Таким образом можно по интенсивности излучаемой флуоресценции клеток диагностировать триплоидию у рыб относительно известного диплоидного контроля. Интенсивность флуоресценции коррелирует с количеством наборов хромосом в каждом анализируемом массиве клеток. Ранее авторами была разработана методика выделения эмбриональных клеток рыб на самых ранних этапах эмбриогенеза и апробирована для дифференциальной диагностики индуцированной триплоидии нельмы (Golotin et al., 2023), используя метод проточной цитометрии (рис., В).

При использовании вышеописанных методов, степень генетических различий плоидности оценивают, используя изначально живые клетки или ткани. Эти ограничения являются существенными при работе с субфоссильными и музейными образцами, делающие невозможность изучения плоидности. Поэтому для изучения наиболее доступным является анализ ДНК (Литвинчук и др., 2002). Среди большинства известных методов при анализе ДНК главным недостатком является её внутривидовая изменчивость, затрудняющая анализ плоидности, например, при наличии межвидовой гибридизации (Litvinchuk et al., 1999; Alves et al., 2001; Evans et al., 2004). Анализ коротких повторов ДНК, как правило, лишен этого недостатка, поэтому в этом случае микросателлитный анализ

плоидности ДНК-содержащих тканей таких образцов имеет преимущество. ПЦР-продукты микросателлитных локусов разделяют с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза. Анализируя длину фрагментов микросаттелитов можно судить об аллелях локуса и об их количествах (повторов) (рис., Г). Как известно диплоидный организм содержит два локуса гомологичных хромосом, поэтому по количеству таких локусов возможно определить также и плоидность (Howard et al., 2023).

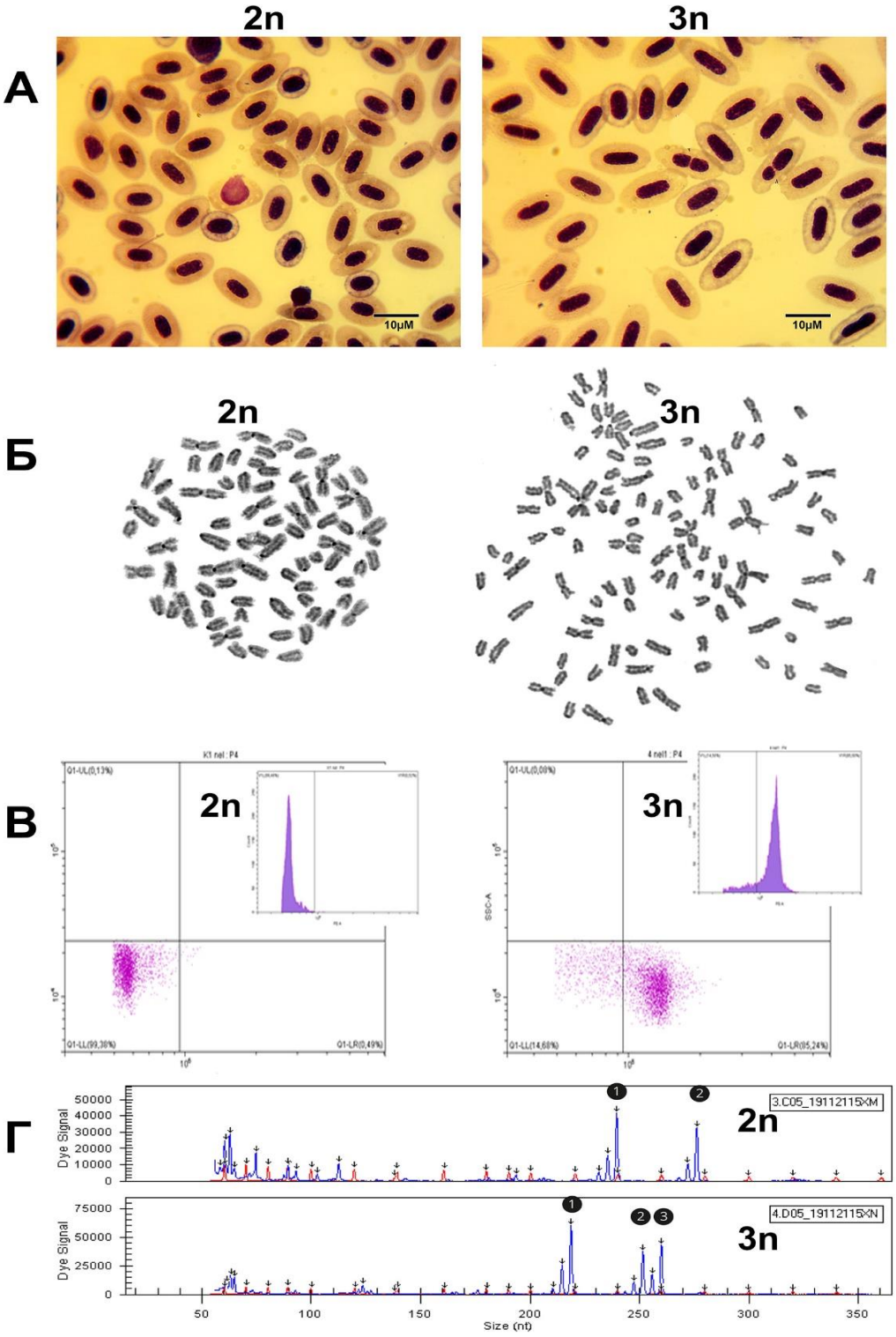

Рисунок. Методы диагностики триплоидии: А – Визуальный метод, основанный на размерах ядер клеток. Слева – клетки крови сеголеток диплоидной нельмы (*Stenodus leucichthys nelma*), справа – клетки

триплоидов нельмы (окраска по Паппенгейму); Б – митотические пластинки предпочки *S. l. nelma* – метод, основанный на подсчёте количества хромосом. Слева – митотическая пластика диплоида (2n, 76 хромосом), справа – триплоида (3n, 114 хромосом). В – Точечные графики и гистограммы распределения содержания ДНК в выделенных эмбриональных единичных клетках нельмы (Golotin et al., 2023), окрашенных иодидом пропидия, полученные методом проточной цитометрии (PE-канал). На оси абсцисс показано содержание ядерной ДНК клеток в фазе G1 клеточного цикла, которое выражается в произвольных единицах интенсивности флуоресценции, все оси и разделительные линии зафиксированы в одинаковых положениях (слева диплоиды, справа – триплоиды); Г – способ определения плоидности фрагментным анализом ДНК. Три отчетливых пика (верхний и нижний графики) или два пика (два графика посередине) свидетельствуют о триплоидии и диплоидии (и/или гомозиготной триплоидии) соответственно. Пики показывают интенсивность флуоресценции при определенных размерах фрагментов. Ранние пики около 50–100 пар оснований являются ошибками ПЦР (Howard et al., 2023)

Таким способом триплоидию можно диагностировать разными способами в зависимости от задач. Все вышеописанные методы в настоящее время используются авторами в научных поисках для диагностики индуцированной триплоидии. Для получения рыб-триплоидов в индустриальных условиях особенно важно диагностировать триплоидию, имея два или более научных метода. Особенно важна своевременная диагностика именно на самых ранних этапах эмбриогенеза (на стадии бластулы) для холодноводных сиговых видов рыб, эмбриональное развитие которых происходит до полугода.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта РНФ №23-26-00257.

Список литературы

1. Вылка М.М., Лютиков А.А., Голотин В.А. Диагностика триплоидии сиговых рыб в поздний эмбриональный период путем сравнения морфологии крови // Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса : Материалы XI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. СПб., 2023. С. 55-57.
2. Гомельский Б.И., Грунина А.С. Искусственная полиплоидия у рыб и возможности её использования в рыбоводстве // Рыбное хозяйство. 1988. С. 54.
3. Кирпичников В.С. Генетические основы селекции рыб. Л.: Наука, 1987. 519 с.
4. Литвинчук С.Н., Казаков В.И., Анацкий С.Ю. Музейные коллекции животных в молекулярно-генетических исследованиях // Успехи современной биологии. 2002. Вып. 122(5). С. 444-448
5. Лютиков А.А., Костюничев В.В., Голотин В.А., Вылка М.М. Предварительные результаты исследований по искусственной триплоидизации сиговых рыб // Развитие и современные проблемы аквакультуры: сборник научных трудов III Международной научно-практической конференции (с. Дивноморское, 4 – 10 сентября 2023 г.) / ред. кол. Б.Ч. Месхи [и др.]; ДГТУ / Ростов-на-Дону: ДГТУ-Принт, 2023. С. 55-59.
6. Allen Jr. S.K., Stanley J.G. Triploid grass carp: Status and management implications // Fisheries. 1983. Vol. 12(4). P. 20-24
7. Alves J.M., Coelho M.M., Callares-Pereira M.J. Evolution in action through hybridization in an Iberian freshwater fish: a genetic review // Genetica. 2001. Vol. 111. P. 375-385
8. Arai K. Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos // Mem. Fac. Fish. Sci. 1984. Vol. 31(1,2). P. 1-94
9. Evans B.J., Kelley D.B., Tinsley R.C., Melnick D.J., Cannatella D.C. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploidy evolution // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. Vol. 33. P. 197-213
10. Golotin V., Lyutikov A., Filatova T., Sharoyko V., Apalikova O. A Rapid and Simple Procedure for the Isolation of Embryonic Cells from Fish Eggs // Bio Protoc. 2023. Vol. 13(19). P. 0e4836. doi: 10.21769/BioProtoc.4836
11. Haffray P., Aubin J., Houis V., Labble L., Jalabert B. Comparison of pressure or thermal treatments on triploid yield and malformation up to swim up stage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. 2007. Vol. 272. P. S265.
12. Howard C., Taggart J.B., Bradley C.R., Gutierrez A.P., Taylor J.F., Prodöhl P.A., Migaud H., Bekaert M. DNA extraction from recently fertilised Atlantic salmon embryos for use in microsatellite validation of triploidy // PLoS One. 2023. Vol. 18(10). P. e0292319. doi: 10.1371/journal.pone.0292319.
13. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. 1980. Vol. 36. P. 1014-1015

14. Litvinchuk S.N., Borkin L.J., Dukiæ G., Kaleziæ M.L., Khalturin M.D., Rosanov Y.M. Taxonomic status of Triturus karelinii on the Balkans, with some comments about other crested newt taxa // Russ. J. Herpetol. 1999. Vol. 6. P. 153-163.
15. Maxime V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish// Fish Fish. 2008. Vol. 9. P. 67-78.
16. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat. Protoc. 2006. Vol. 1(3). P. 1458-1461.
17. Schneider C., Rasband W., Eliceiri K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. P. 671-675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089
18. Soldatov A., Kukhareva T., Morozova V., Richkova V., Andreyeva A., Bashmakova A. Morphometric parameters of erythroid hemocytes of alien mollusc Anadara kagoshimensis under normoxia and anoxia // Ruthenica. 2021. Vol. 31(2). P. 77-86.
19. Thorgaard G.H., Jazwin M.E., Stier A.R. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout // T. Am. Fish. Soc. 1981. Vol. 110. P. 546-550.
20. Thorgaard G.H., Rabinovitch P.S., Shen M.W., Gall G.A.E., Propp J., Utter F.M. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry // Aquaculture. 1982. Vol. 29. P. 305-309.
21. Toth B., Varkonyi A., Hidas A., Edvine Meleg E., Varadi L. Genetic analysis of offspring from intra- and interspecies crosses of Carassius auratus gibelio by chromosome and RAPD analysis // J. Fish Biol. 2005. Vol. 66. P. 784-797.