

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРУДОВОГО  
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА (ВНИИПРХ)

На правах рукописи

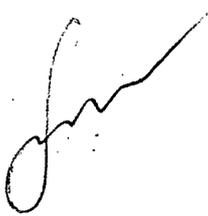
ГРУНИНА АННА СЕМЕНОВНА

УДК 575.1:591

**ИНДУЦИРОВАННЫЙ ДИПЛОИДНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ У РЫБ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ РАБОТАХ**

03.00.10 - ИХТИОЛОГИЯ

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук



Москва - 1992

Работа выполнена во Всесоюзном научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор  
**А. А. Нейфак**

кандидат биологических наук, старший научный  
сотрудник **Б. И. Гомельский**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**С. Г. Васецкий**

доктор биологических наук  
**В. П. Васильев**

Ведущее учреждение: Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова (кафедра ихтиологии)

Защита состоится 16 июня 1992 г. в 11 час. на заседании специализированного совета Д 117.04.01 при Всесоюзном научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства по адресу: 141821 Московская обл., Дмитровский район, п. Рыбное, ВНИИПРХ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всесоюзного научно-исследовательского института прудового рыбного хозяйства.

Автореферат разослан 13 апреля 1992 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
кандидат биологических наук

**С. П. Тряпкина**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** В настоящее время большое внимание уделяется разработке специальных генетических методов селекции рыб. Одним из таких методов является индуцированный диплоидный андрогенез, предполагающий получение организмов, развитие которых происходит под контролем отцовской наследственности. Для получения диплоидного андрогенеза необходимо с помощью специальных воздействий инактивировать генетический аппарат яйцеклетки и вызвать удвоение (диплоидизацию) мужского хромосомного комплекса.

Спектр возможного применения индуцированного диплоидного андрогенеза достаточно широк. Так, с помощью андрогенеза можно получать высокоинбредные линии и клоны. Андрогенез может использоваться также для регуляции пола рыб. Особый интерес данный метод представляет в связи с возможностью использования его для сохранения редких и исчезающих видов а также ценных генотипов пород культивируемых рыб. При этом предполагается, что с помощью андрогенеза можно восстанавливать генотипы рыб из криоконсервированной спермы. Значение этого подхода к проблеме сохранения ценных генофондов в существенной мере определяется тем, что способы криоконсервации спермы рыб уже в основном разработаны, в то время как задача длительного хранения яйцеклеток и зародышей пока не решена.

Вместе с тем в работах по индуцированному диплоидному андрогенезу у рыб достигнуты лишь первые успехи. С помощью радиационной инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса с использованием гидростатического давления осуществлен диплоидный андрогенез у нескольких видов лососевых рыб. Другие же виды, в том числе такие важные объекты как карповые и осетровые рыбы, этими исследованиями пока охвачены не были. До настоящего времени не решена задача получения массовых андрогенетических потомств а также не получены плодовитые андрогенетические особи, что препятствует практическому использованию данного метода.

Восстановление генотипа вида методом диплоидного андрогенеза предполагает осеменение криоконсервированной спермой этого вида генетически инактивированных яйцеклеток близких видов рыб и диплоидизацию мужского хромосомного комплекса, т.е. получение андрогенетических ядерно-цитоплазматических диплоидных гибридов. Однако у рыб, как и у позвоночных в целом, подобные гибриды пока не получены.

Представляемая работа проводилась в рамках программы "Низкотемпературный генетический банк промысловых и редких видов рыб и

водных беспозвоночных" (шифр "Криобанк рыб").

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ.** Цель работы заключалась в дальнейшей разработке метода индуцированного диплоидного андрогенеза у рыб и определении перспектив его использования в селекционно-генетических работах.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать возможность получения диплоидного андрогенеза у рыб с помощью теплового шока при использовании вьюна в качестве модельного объекта. Определить оптимальные условия применения теплового шока для индукции диплоидного андрогенеза у вьюна.

2. Осуществить диплоидный андрогенез у сибирского осетра. Определить оптимальные условия экспериментальных воздействий для инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса у данного вида.

3. Осуществить диплоидный андрогенез у карпа. Определить оптимальные условия экспериментальных воздействий для инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса у данного вида.

4. Индуцировать диплоидный андрогенез с использованием криоконсервированной спермы (на примере карпа).

5. Исследовать возможность получения плодовитых андрогенетических рыб (на примере карпа).

6. Исследовать возможность получения андрогенетических ядерно-цитоплазматических диплоидных гибридов у рыб (на примере карповых рыб).

7. Получить андрогенетическое диплоидное потомство от гибридов серебряного караса с карпом.

#### НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

1. Показано, что тепловой шок способен вызывать индукцию диплоидного андрогенеза у рыб за счет блокирования первого деления дробления у гаплоидных андрогенетических зародышей.

2. Впервые осуществлен диплоидный андрогенез у вьюна. Определены оптимальные условия применения теплового шока для индукции диплоидного андрогенеза у этого вида.

3. Впервые осуществлен диплоидный андрогенез у сибирского осетра. Определены оптимальные условия экспериментальных воздействий для инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса у данного вида.

4. Впервые осуществлен диплоидный андрогенез у карпа. Опреде-

лены оптимальные условия экспериментальных воздействий для инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса у данного вида. Получено диплоидное андрогенетическое потомство карпа с использованием криоконсервированной спермы.

5. Впервые у рыб получены половозрелые андрогенетические самцы (андрогенетические самцы карпа). В результате скрещивания этих самцов с обычными самками карпа получено однополо-мужское потомство (самцы XY). Тем самым доказано, что андрогенетические самцы карпа имеют генетическую формулу YY. От андрогенетического самца карпа получено также второе поколение андрогенеза, представляющее собой клон.

6. При скрещивании карпа с серебряным карасем впервые у позвоночных методом андрогенеза получены диплоидные ядерно-цитоплазматические гибриды.

7. Получено андрогенетическое диплоидное потомство от инвертированных самцов карасекарповых гибридов. Благодаря диплоидности гамет у этих самцов данное потомство получено без применения теплового шока.

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ.** Получение диплоидного андрогенеза у рыб с помощью теплового шока представляет большой практический интерес. По сравнению с гидростатическим давлением, применявшимся для этой цели ранее, тепловой шок является более доступным способом воздействия, поскольку для использования его не требуется специального оборудования. Кроме того, тепловой обработке достаточно просто подвергать большие партии икры. В этой связи применение теплового шока для индукции диплоидного андрогенеза у рыб позволяет относительно упростить существующую методику индуцированного андрогенеза и открывает возможность получения андрогенетических диплоидов в массовых количествах.

Разработанные методики дают возможность получать диплоидные андрогенетические потомства хозяйственно ценных видов - карпа и сибирского осетра.

Возможность получения плодовитых андрогенетических рыб, показанная на примере карпа, открывает перспективы использования андрогенеза в селекционно-генетических работах для получения высокоинбредных линий и клонов. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования андрогенетических самцов YY в качестве производителей для генетической регуляции полового состава выращиваемых рыб, а именно, получения однополо-мужских потомств. Это может иметь большое значение при культивировании тех видов, у которых самцы обладают преимуществом в росте.

Успешное получение диплоидного андрогенеза у карпа с использованием криоконсервированной спермы а также получение андрогенетических ядерно-цитоплазматических диплоидных гибридов открывает перспективы использования андрогенеза для сохранения генотипов ценных пород и исчезающих видов рыб.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Материалы работы докладывались на школе по криобиологии (Харьков, 1990), заседании Координационного совета по программе "Криобанк рыб" (Пушино, 1990) и на коллоквиуме селекционно-генетического центра НПО по рыбоводству (Рыбное, 1991).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По теме диссертации опубликовано 8 работ.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение), заключения и выводов. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, включая 8 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 114 работ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы

Исследования проводились в 1989-1991 гг. в лаборатории биохимической эмбриологии Института биологии развития АН СССР и селекционно-генетическом центре НПО по рыбоводству.

Объектами исследований являлись вьюн, сибирский осетр и карповые рыбы - карп, серебряный карась (двуполая форма) и карасекарповые гибриды.

В качестве материала в опытах использовали вьюнов из естественных популяций. Половые продукты сибирского осетра были получены на Конаковской производственно-экспериментальной базе, а карповых рыб - на Центральной экспериментальной базе НПО по рыбоводству. В опытах использовалась также криоконсервированная сперма карпа, которая была любезно предоставлена нам Е.Ф.Копейкой (Институт проблем криобиологии и криомедицины, г.Харьков)

Все опыты проводились в 2-3 повторностях. В опытах использовали смесь половых продуктов, полученных от нескольких самок и самцов. Исключением являлись опыты на осетре, в каждом из которых использовали икру от одной самки. Развитие зародышей проходило в чашках Петри. В отдельных вариантах опытов, проводившихся на вьюне, осетре и карповых рыбах использовали соответственно по 200-700, 70-140 и 300-500 яиц.

При использовании в опытах криоконсервированной спермы карпа размораживание ее и осеменение ею икры производилось в соответствии с имеющейся методикой (Копейка, 1986).

Индукцию андрогенетического развития вызывали путем оплодотворения генетически инактивированных яйцеклеток интактной спермой. С целью инактивации хромосом яйцеклетки подвергали рентгеновскому облучению, которое производилось на аппаратах РУМ-17 или РУП-200 в режиме 190-210 кВ, 15 мА, без фильтра при мощности дозы от 1 до 2,5 кР.

Для определения оптимальных инактивирующих доз радиации яйцеклетки облучали в различных дозах в диапазоне от 0,5 до 70-90 кР. О действии радиации на генетический аппарат яйцеклеток судили по дозовой зависимости выживаемости зародышей и личинок. Контролем служили диплоидные зародыши, развивающиеся из необлученной икры.

В опытах на карпе для подтверждения инактивации женских хромосом в качестве маркеров использовали рецессивные гены, контролирующие окраску или тип чешуйного покрова рыб (гены  $b_1$   $b_2$  и  $s$ ).

Для индукции диплоидного андрогенеза гаплоидных андрогенетических зародышей, полученных в результате оплодотворения генетически инактивированных яйцеклеток интактной спермой подвергали тепловому шоку при различных условиях на определенных стадиях развития. До тепловой обработки зародыши инкубировались при постоянной температуре.

Для определения времени наступления нужной стадии развития использовали величину  $T_c$  - безразмерную временную характеристику развития, равную продолжительности одного митотического цикла в период синхронных делений дробления при данной температуре (Детлаф, Детлаф, 1960).

Для получения шока зародышей переносили в ультратермостат с необходимой температурой воды. После тепловой обработки инкубация зародышей проходила при температуре 18-22 °С. Контролем служили гаплоидные зародыши не подвергавшиеся тепловому шоку.

Показателем индукции диплоидного андрогенеза являлось получение морфологически нормальных, активно плавающих личинок, которые четко отличались от аномальных гаплоидов. В отдельных опытах для подтверждения диплоидности полученных личинок использовали анализ числа ядрышек либо кариологический анализ. Подсчет ядрышек проводили в интерфазных ядрах клеток плавниковой каймы личинок с использованием стандартной ацетокарминовой методики. Для получения препаратов хромосом личинок выдерживали в 0,05% растворе колхицина. Препараты готовили с помощью сухо-воздушной методики и окраши-

вали по Романовскому.

Выход диплоидных андрогенетических личинок выражали в процентах от числа оплодотворенных яиц. Последний показатель определяли с учетом процента оплодотворения, полученного в гаплоидном контроле, поскольку непосредственное его определение в опытных партиях было затруднено из-за гибели части зародышей в результате тепловой обработки уже на ранних стадиях развития.

В исследованиях, проводившихся на карпе, был использован трансплантационный тест. В качестве трансплантата служил анальный плавник. Операция по пересадке плавников была выполнена М.И. Абраменко (Ростовский университет) по разработанной им методике (Абраменко, 1985).

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами (Урбах, 1964).

#### Исследование по индуцированному диплоидному андрогенезу у вьюна

Исследования на модельном объекте вьюне проводились с целью изучения возможности получения диплоидного андрогенеза у рыб с помощью теплового шока. Эта задача облегчалась тем, что гаплоидный андрогенез у вьюна был получен ранее (Нейфах, 1959; Ромашов, Беляева, 1965).

Яйца вьюна были облучены в дозе 25 кР. Известно (Нейфах, 1959; Ромашов, Беляева, 1965), что эта доза радиации обеспечивает практически полную инактивацию ядер яйцеклеток вьюна, не вызывая при этом заметных повреждений цитоплазмы. В результате оплодотворения облученных яиц интактной спермой были получены андрогенетические гаплоиды, которые отличались комплексом морфологических аномалий, характерных для гаплоидного синдрома и погибали не позднее, чем через 5-6 дней после вылупления.

С целью изучения эффективности применения теплового шока для индукции диплоидного андрогенеза у вьюна были проведены следующие опыты. В первом из них андрогенетических гаплоидных зародышей подвергали тепловому шоку при температуре 37°C продолжительностью 3 мин. в разные сроки первого деления дробления (борозда первого деления дробления появлялась у зародышей через 2,5 $\tau_0$  после осеменения), начиная от 1,35 до 2,4 $\tau_0$  после осеменения с интервалом между вариантами 0,15 $\tau_0$ . Применение теплового шока приводило к появлению нормальных жизнеспособных личинок. Их диплоидность была подтверждена с помощью подсчета ядрышек. Очевидно, что получение таких ли-

чинок явилось следствием блокирования первого деления дробления в результате тепловой обработки зародышей и свидетельствует об индукции диплоидного андрогенеза у вьюна.

В данном опыте диплоидные андрогенетические личинки были получены в результате применения теплового шока через 1,35–1,5 и 1,8–2,4  $\tau_0$  после осеменения (рис. 1). В интервале между этими воздействиями (1,6–1,7  $\tau_0$ ) шок вызывал практически полную гибель зародышей вследствие их повышенной термочувствительности в этот период. Эти данные указывают на то, что тепловой шок, по-видимому, способен вызывать диплоидизацию мужского хромосомного комплекса при воздействии на две различные фазы первого митотического цикла. Сходную картину наблюдали Парсонс и Торгаард (Parsons, Thorgaard, 1985) и Мэй с соавторами (May et al., 1988) при использовании гидростатического давления для индукции диплоидного андрогенеза у радужной форели и американской палии.

Максимальная частота андрогенетических диплоидных личинок была получена при использовании теплового шока через 2,25  $\tau_0$  после осеменения. Этот срок соответствует, по-видимому, анафазе первого деления дробления (Игнатьева, 1979).

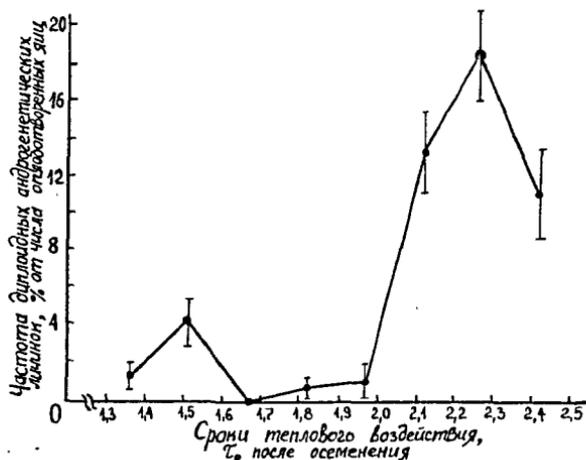


Рис. 1. Частота диплоидных андрогенетических личинок вьюна в зависимости от сроков применения теплового шока (37 С, 3 мин).

Во втором опыте для определения оптимальных параметров обработки зародышей подвергали шокам при температурах 35–38°C продолжительностью от 1,5 до 6 мин. в период, когда частота андрогенетических диплоидов в первом опыте была максимальной. Данный опыт показал, что оптимальным для индукции диплоидного андрогенеза у вьюна является тепловой шок при 37°C в течение 3 мин. (см. табл.).

Частота андрогенетических диплоидных личинок вьюна при различных условиях тепловой обработки гаплоидных зародышей в возрасте 2,1–2,3 $\bar{t}_0$ .

| Температура, °C | Продолжительность, мин. | Частота андрогенетических диплоидных личинок |                                |
|-----------------|-------------------------|--|--------------------------------|
|                 |                         | число личинок                                | % от числа оплодотворенных яиц |
| 35              | 3                       | 1  | 0,4±0,39                       |
|                 | 6                       | 1  | 0,2±0,19                       |
| 36              | 1,5                     | 0  | 0,0±0,62                       |
|                 | 3                       | 1  | 0,4±0,38                       |
|                 | 6                       | 5  | 1,7±0,74                       |
| 37              | 1,5                     | 1  | 0,3±0,29                       |
|                 | 3                       | 11   | 5,0±1,47                       |
|                 | 6                       | 0  | 0,0±0,51                       |
| 38              | 1,5                     | 1  | 0,4±0,38                       |
|                 | 3                       | 0  | 0,0±0,36                       |

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что тепловой шок является эффективным средством для индукции диплоидного андрогенеза у вьюна. Выход андрогенетических диплоидов при его использовании в отдельных опытах составил до 20% от числа оплодотворенных яиц. Это соответствует лучшим результатам, полученным ранее на других видах рыб при использовании гидростатического давления (Parsons, Thorgaard, 1985; May et al., 1988). Таким образом данные, полученные нами на модельном объекте – вьюне,

указывают на возможность применения теплового шока для получения андрогенетических диплоидов у рыб.

Исследование по индуцированному диплоидному андрогенезу у сибирского осетра

Задачей данного исследования являлось осуществление диплоидного андрогенеза у сибирского осетра. Проведение такой работы на осетровых рыбах представляло интерес в связи с предполагаемой возможностью использования данного метода для сохранения редких и исчезающих видов.

Было проведено два опыта. В первом опыте определяли оптимальную дозу радиации для инактивации ядер яйцеклеток сибирского осетра, поскольку ранее такая доза установлена не была. Яйцеклетки облучали в диапазоне доз от 0,5 до 70 кР (всего было испытано 14 доз) и оплодотворяли интактной спермой. Дозовая зависимость выживаемости зародышей на нескольких стадиях развития показана на рис. 2.

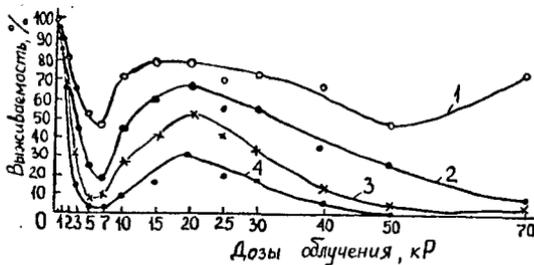


Рис. 2. Выживаемость зародышей сибирского осетра на стадиях 31 (1), 33 (2) и 35 (3) (по Гинзбург и Детлаф, 1969) и однодневных личинок<sup>(4)</sup> в зависимости от дозы облучения яйцеклеток.

При облучении яйцеклеток в дозах 0,5–1 кР выживаемость зародышей относительно необлученного контроля снижалась незначительно. С увеличением дозы облучения выживаемость понижалась и имела наименьшее значение при дозе 7 кР. При дальнейшем повышении дозы вы-

живаемость увеличивалась и достигала максимума при облучении яйцеклеток в дозе 20 кР. Полученные при этом личинки отличались комплексом внешних аномалий, характерных для гаплоидного синдрома

По мере дальнейшего повышения доз радиации происходило повторное снижение выживаемости зародышей. При облучении яйцеклеток в дозах 50 и 70 кР ни один из зародышей не достиг стадии вылупления.

Таким образом, при увеличении доз облучения яйцеклеток сибирского осетра четко проявлялся эффект Гертвига, который выражался в увеличении выживаемости зародышей начиная с дозы 10 кР и свидетельствовал об инактивации ядер яйцеклеток и переходе зародышей на андрогенетический путь развития. Очевидно, что доза 20 кР, при которой выживаемость андрогенетических зародышей была наивысшей, является оптимальной для индукции андрогенетического развития у сибирского осетра. Снижение выживаемости зародышей при дальнейшем повышении доз обусловлено радиационным повреждением цитоплазматических структур яйцеклеток.

Для индукции диплоидного андрогенеза гаплоидных андрогенетических зародышей подвергали тепловому шоку при 37°C в течение 3 мин. на стадии первого деления дробления в период от 1,35 до 3  $T_0$  после осеменения с интервалом между вариантами 0,1  $T_0$  (опыт 2). Применение теплового шока привело к получению внешне нормальных, активно плавающих личинок, которые являлись андрогенетическими диплоидами. Максимальный выход андрогенетических диплоидных личинок осетра (12,2% от числа оплодотворенных яиц) был получен в результате применения шока через 1,6  $T_0$  после осеменения (рис. 3).

Полученные нами андрогенетические диплоидные личинки сибирского осетра погибли незадолго до перехода на активное питание. Причиной их гибели, по всей вероятности, являлось проявление рецессивных леталей, обусловленное переходом всех генов в гомозиготное состояние в результате блокирования первого деления дробления. Полученные данные свидетельствуют о том, что осетровые, по-видимому, более чувствительны к резкому повышению уровня гомозиготности, по сравнению с другими рыбами. Эти данные согласуются с результатами исследований Ромашова с соавторами (Ромашов и др., 1963), которые наблюдали высокую гибель в гиногенетических потомствах осетровых рыб. Учитывая полученные нами результаты представляется целесообразным проведение исследований, направленных на осуществление диспермического андрогенеза у осетровых рыб. Получение его позволило бы в значительной мере снизить уровень гомозиготности андрогенетических диплоидов и способствовало бы таким образом повышению их жизнеспособности.

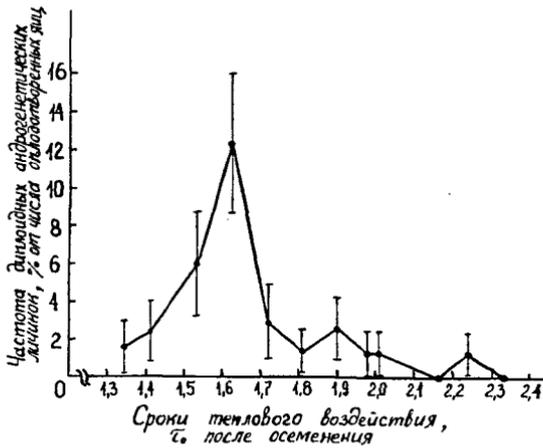


Рис. 3. Частота диплоидных андрогенетических личинок сибирского осетра в зависимости от сроков применения теплового шока (37 °С, 3 мин.)

#### Исследование по индуцированному диплоидному андрогенезу у карпа.

В первых опытах по андрогенезу у карпа для проверки генетической инактивации яйцеклеток в скрещиваниях использовали нормально пигментированных самок и цветных самцов, окраска которых определяется двумя рецессивными генами  $b_1$  и  $b_2$  (Катасонов, 1978). На эмбриональных и личиночных стадиях гомозиготы  $b_1b_1b_2b_2$ , а также гаплоиды  $b_1b_2$  выглядят прозрачными и четко отличаются от нормально пигментированных особей. Таким образом, отсутствие пигментации у зародышей и личинок указывало на достаточно полную инактивацию женского ядра.

С использованием спермы цветных карпов было проведено три опыта. В первом опыте определяли дозу радиации, вызывающую инактивацию ядер яйцеклеток у карпа. Было испытано 15 доз в диапазоне от 0,5 до 90 кР. Облученные яйцеклетки оплодотворяли интактной спермой. Для контроля помимо диплоидных зародышей были получены также гиногенетические зародыши путем осеменения интактных яиц спермой, облученной в дозе 80 кР.

Как и в аналогичном опыте с осетром (см. выше), при облучении яйцеклеток карпа в возрастающих дозах был получен эффект Гертвига, который выражался в повышении выживаемости зародышей после дозы 15 кР и свидетельствовал об инактивации ядер яйцеклеток и индукции андрогенетического развития (рис. 4). О получении андрогенеза можно было судить также по появлению непигментированных зародышей, количество которых по мере увеличения доз возрастало, составляя при дозах 15, 20, и 25-30 кР соответственно 85, 95, и 99% от общего числа. Однако даже при облучении яиц в дозах 25, 30 и 50 кР были обнаружены единичные пигментированные зародыши. Как и ожидалось, все диплоидные зародыши в контроле, а также гиногенетические зародыши были пигментированными.

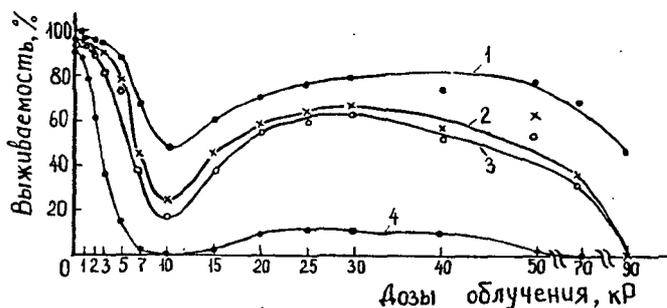


Рис. 4. Выживаемость зародышей карпа в возрасте 72 (1), 110 (2) и 156 (3)  $T_0$ , а также однодневных личинок (4) в зависимости от дозы облучения яйцеклеток.

В результате данного опыта было установлено, что оптимальными для инактивации ядер яйцеклеток карпа являются дозы 25-30 кР, при которых выживаемость андрогенетических зародышей была наивысшей (см. рис.).

В последующих двух опытах для индукции диплоидного андрогенеза гаплоидных андрогенетических зародышей подвергали тепловому шоку при различных условиях в разные сроки первого деления дробления. Полученные в этих опытах данные показали, что оптимальным для индукции диплоидного андрогенеза у карпа является тепловой шок при температурах 40-40,5 или 41°C продолжительностью 3 или 2 мин., применяемый через 1,7-1,9  $\tau_0$  после осеменения (рис. 5 и 6). Тепловой шок со сходными параметрами эффективно подавлял первое деление дробления при получении гиногенетических диплоидов этого вида (Гомельский и др., 1989). Оптимальные условия применения экспериментальных воздействий совпадали также при получении гино- и андрогенетических диплоидов радужной форели (Chourrout, 1984; Parsons, Thorgaard, 1985). Очевидно, что когда условия применения экспериментальных воздействий, вызывающие блокирование первого деления дробления у гиногенетических зародышей данного вида уже определены, получение андрогенетических диплоидов может осуществляться с их использованием без проведения предварительных опытов.

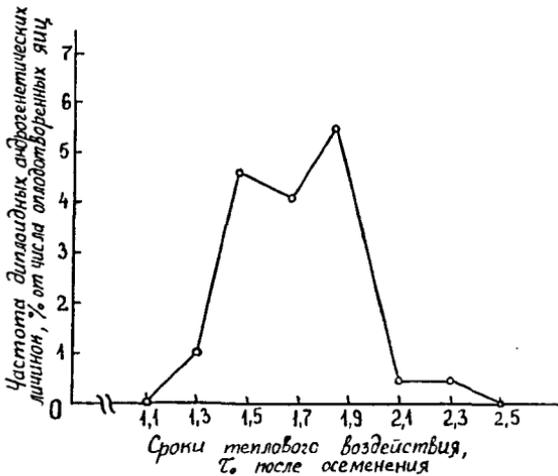


Рис. 5. Частота диплоидных андрогенетических личинок карпа в зависимости от сроков применения теплового шока (40°C, 3 мин.)

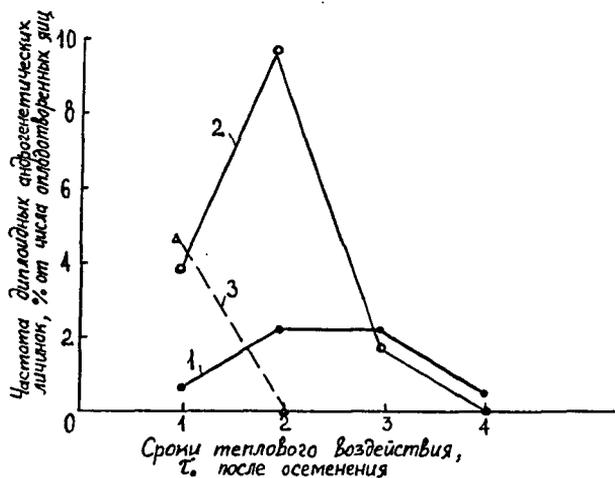


Рис. 6. Частота диплоидных андрогенетических личинок карпа, полученных в результате применения теплового шока при температурах 40 (1), 41 (2) и 42°C (3) продолжительностью 1-4 мин. через 1,7  $t_0$  после осеменения.

Среди нормальных жизнеспособных личинок, полученных нами в последних двух опытах, были обнаружены единичные пигментированные особи. Появление пигментированных зародышей и личинок, наблюдаемое нами в опытах по гаплоидному (см. выше) и диплоидному андрогенезу свидетельствует о возможности сохранения и экспрессии части материнского генома при облучении яйцеклеток карпа ионизирующей радиацией в высоких дозах. Сходная картина наблюдалась при облучении ионизирующей радиацией спермиев рыб в работах по индуцированному гиногенезу (Ijiri, 1980, 1983; Chourrout, Quillet, 1982 и др.). По-видимому, это связано с особенностями действия ионизирующей радиации, инактивирующий эффект которой достигается за счет множественной фрагментации хромосом.

В дальнейших опытах в качестве материала для получения диплоидного андрогенеза у карпа использовались чешуйчатые самки (генотип S-) и самцы с разбросанным типом чешуйного покрова (генотип ss). Доказательством андрогенеза в этом случае служило получение в потомстве исключительно "разбросанных" карпов. Полученных в этих опытах андрогенетических диплоидов выращивали в аквариаль-

ной при температуре 22-24°C. Их выживаемость на личиночных и мальковых стадиях была низкой. Наибольшая гибель личинок (до 70-80% от общего числа) наблюдалась на стадии перехода на активное питание. У части рыб (10-15%) имелись различные морфологические дефекты. Эти явления, по-видимому, обусловлены проявлением вредных рецессивных генов вследствие перехода их в гомозиготное состояние а также повреждающим влиянием теплового шока. На поздних же стадиях гибели рыб практически не наблюдалось.

Андрогенетическое диплоидное потомство карпа было получено нами также с использованием криоконсервированной спермы. При этом характеристики рыб, полученных с использованием криоконсервированной и нативной спермы были сходными. Эти данные доказывают возможность практического применения андрогенеза для восстановления генотипов рыб из криоконсервированной спермы.

Андрогенетические самцы карпа в возрасте одного года достигли половой зрелости. В связи с мужским типом гетерогаметности у карпа ( $\text{♀ XX}:\text{♂ XY}$ ), эти самцы должны иметь генетическую формулу YY, что и было доказано в результате исследования их потомств, полученных от скрещивания с обычными самками карпа. Все особи в этих потомствах оказались самцами. Полученные данные указывают на возможность использования андрогенетических самцов YY в качестве производителей для генетической регуляции полового состава выращиваемых рыб.

От одного из андрогенетических самцов карпа нами было получено также андрогенетическое потомство. Это потомство имело более высокую выживаемость относительно первого поколения андрогенеза (соответственно 60 и 30% на стадии перехода на активное питание), что, по-видимому, объясняется элиминацией рецессивных летален, прошедшей в первом поколении андрогенеза. По данным Стрейзингера с соавторами (Streisinger et al., 1981) повышение выживаемости наблюдалась во втором гиногенетическом поколении у данио.

В связи с полной гомозиготностью исходного андрогенетического самца карпа и однородностью вследствие этого продуцируемых им гамет второе поколение андрогенеза должно состоять из генетически идентичных особей. т.е. представлять собой клон. Это было подтверждено с помощью трансплантационного теста. Андрогенетические клоны могут служить ценным материалом как для практической селекции, так и для генетических исследований.

Таким образом, благодаря получению плодовитых андрогенетических рыб открывается возможность практического использования андрогенеза для ускоренного получения гомозиготных линий и регуляции пола.

Исследование по получению диплоидного андрогенеза в сочетании с гибридизацией (на примере карповых рыб)

В настоящем разделе приводятся результаты опытов по получению диплоидных ядерно-цитоплазматических гибридов у рыб методом андрогенеза. Как уже указывалось, получение подобных гибридов является необходимым условием, определяющим возможность использования данного метода для сохранения редких и исчезающих видов. Ранее андрогенетические диплоидные гибриды были получены лишь у шелкопряда (Астауров, Острякова-Варшавер, 1957).

Материалом для получения андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов служила икра карпа и сперма серебряного карася. Поскольку в качестве материнского вида нами использовался карп, условия применения экспериментальных воздействий были такими же, как при получении андрогенеза у карпа.

В результате оплодотворения облученной икры карпа (25 кР) интактной спермой серебряного карася были получены андрогенетические ядерно-цитоплазматические гаплоидные гибриды. Доказательством полной инактивации ядер яйцеклеток карпа и индукции андрогенетического развития являлось отсутствие пигментации у зародышей и личинок, полученных в параллельных опытах в результате оплодотворения облученной икры нормально пигментированных самок (генотип  $B_1B_2$ ) спермой цветных карпов (генотип  $b_1b_2$ ).

Получение андрогенетических диплоидных гибридов достигалось в результате диплоидизации мужского хромосомного комплекса за счет подавления первого деления дробления у гаплоидных гибридных зародышей с помощью теплового шока ( $40^{\circ}\text{C}$ , 3 мин.). Диплоидность полученных в опытах личинок была подтверждена данными кариологического анализа: все исследованные личинки (10 шт.), полученные в вариантах с применением теплового шока оказались диплоидными (100 хромосом), в то время как личинки в неподвергавшемся шоку контроле (исследовано 6 шт.) были гаплоидами (50 хромосом). Как и ожидалось, время применения теплового шока, вызывавшего максимальную частоту появления гибридных андрогенетических диплоидных личинок и андрогенетических диплоидных личинок карпа совпадало (1,7-1,9 $\%$  после осеменения), что отражает зависимость скорости развития ранних зародышей от цитоплазмы.

Полученные нами андрогенетические диплоидные гибриды между карпом и серебряным карасем оказались маложизнеспособны. Большая часть из них погибла при переходе на активное питание и лишь единичные личинки доживали до месячного возраста (3 из 53 личинок,

поднявшихся на плав). Вероятно, столь низкая выживаемость этих гибридов обусловлена кумулятивным эффектом гомозиготности и нарушения процессов взаимодействия чужеродных ядра и цитоплазмы. Исходя из этого, нами определены некоторые подходы, направленные на повышение жизнеспособности андрогенетических диплоидных гибридов: использование для получения андрогенеза спермы высокоинбредных самцов, индукция диспермического андрогенеза, использование в качестве объектов исследований систематически менее отдаленных видов.

В данном разделе сообщается также о получении андрогенетического диплоидного потомства от карасекарповых гибридов. Ввиду того, что обычные самцы у этих гибридов стерильны (см. Черфас, Илясова, 1980) в качестве исходного материала в опытах использовались инвертированные гибридные самцы, полученные в результате гормонального переопределения пола у генотипических самок гиногенетического происхождения. В скрещиваниях использовали самок карпа и серебряного караса.

Известно (Гомельский и др., 1985), что в процессе сперматогенеза у инвертированных самцов карасекарповых гибридов за счет трансформации мейоза образуются нередуцированные диплоидные сперматозоиды. Благодаря этому получение от них диплоидного андрогенетического потомства достигалось путем обычного оплодотворения облученной икры без применения теплового шока. Выход полученных таким путем андрогенетических диплоидных гибридов был высоким и практически не отличался от выхода возвратных гибридов, развивающихся из необлученной икры. Это подтверждает имеющиеся данные о том, что облучение икры существенного влияния на успешность андрогенеза не оказывает (Thorgaard et al., 1990)

В отличие от андрогенетических ядерно-цитоплазматических диплоидных гибридов между карпом и серебряным карасем андрогенетические карасекарповые гибриды, полученные нами от инвертированных гибридных самцов, оказались полностью жизнеспособными. Возможность их нормального развития как в случае использования в опытах яйцеклеток карпа, так и яйцеклеток караса несомненно объясняется наличием у них геномов каждого из этих видов вследствие нередукции га-

## ВЫВОДЫ

1. Диплоидный андрогенез у рыб может быть получен путем радиационной инактивации ядер яйцеклеток и диплоидизации мужского хромосомного комплекса за счет блокирования первого деления дробления у гаплоидных зародышей с помощью теплового шока.
2. Осуществлен диплоидный андрогенез у вьюна. Оптимальным для индукции диплоидного андрогенеза у этого вида является тепловой шок при температуре 37°C в течение 3 мин., применяемый через 2,25 $\text{C}_0$  после осеменения.
3. Осуществлен диплоидный андрогенез у сибирского осетра. Оптимальными условиями применения экспериментальных воздействий для индукции диплоидного андрогенеза у этого вида являются: облучение яйцеклеток в дозе 20 кР и тепловая обработка андрогенетических гаплоидных зародышей при температуре 37°C в течение 3 мин. через 1,6 $\text{C}_0$  после осеменения.
4. Осуществлен диплоидный андрогенез у карпа. Оптимальными условиями применения экспериментальных воздействий для индукции диплоидного андрогенеза у данного вида являются: облучение яйцеклеток в дозах 25-30 кР и тепловая обработка андрогенетических гаплоидных зародышей при температурах 40-41°C в течение 2-3 мин. через 1,7-1,9 $\text{C}_0$  после осеменения.
5. Получен диплоидный андрогенез у карпа с использованием криоконсервированной спермы. Это доказывает возможность практического применения андрогенеза для восстановления генотипов рыб из криоконсервированной спермы.
6. Андрогенетические самцы карпа имеют генетическую формулу YY и способны достигать половой зрелости. Второе поколение андрогенеза представляет собой гомозиготный клон. Таким образом, индуцированный андрогенез можно использовать для регуляции пола и создания гомозиготных линий.
7. Методом индуцированного андрогенеза получены диплоидные ядерно-цитоплазматические гибриды между карпом и серебряным карасем. Эти гибриды маложизнеспособны, что, вероятно, обусловлено кумулятивным эффектом гомозиготности и нарушения процессов взаимодействия чужеродных ядер и цитоплазмы.
8. Получено андрогенетическое диплоидное потомство от карасе-карповых гибридов. Вследствие диплоидности гамет у исходных инвертированных гибридных самцов данное потомство получено без применения теплового шока.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Нейфах А.А., Грунина А.С. Получение диплоидного андрогенетического потомства вьюна *Misgurnus fossilis* L. с помощью теплового шока. - Онтогенез, 1990, Т. 21, N. 6, С. 642-645.
2. Грунина А.С., Гомельский Б.И., Нейфах А.А. Диплоидный андрогенез у карпа. - Генетика, 1990, Т. 26, N. 11, С. 2037-2043.
3. Грунина А.С., Нейфах А.А. Индукция диплоидного андрогенеза у сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt. - Онтогенез, 1991, Т. 22, N. 1, С. 53-56.
4. Грунина А.С., Гомельский Б.И., Нейфах А.А. Получение андрогенетических диплоидных гибридов между карпом и серебряным карасем. - Генетика, 1991, Т. 27, N. 9, С. 1612-1616.
5. Грунина А.С. Индуцированный диплоидный андрогенез у рыб. - Информ. ВНИЭРХ. Сер.: Аквакультура. Прудовое и озерное рыбоводство, 1991, Вып. 2, С. 21-26.
6. Grunina A.S., Gomelski B.I., Neyfakh A.A. Induced diploid androgenesis in common carp and production of androgenetic diploid hybrids between common and crucian carp. - Abstr. 4th Intern. Symposium on genetics in aquacult. Wuhan-China, 1991. P. 48-49.

