

Комитет Российской Федерации по рыболовству

РГБ ОД
Всероссийский научно-исследовательский институт прудового
рыбного хозяйства

17 АПР 1995

На правах рукописи

РЕКУБРАТСКИЙ Александр Витальевич

УДК 575.24 : 639.3.04

ЭФФЕКТЫ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ ГАМЕТ КАРПА И ВОЗМОЖНОСТЬ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА В
СЕЛЕКЦИИ РЫБ

03.00.15 - генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва, 1995

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор В.Д. Жестяников

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук С.Г. Васецкий

доктор биологических наук В.П. Васильев

Ведущее учреждение: Московский государственный университет
(биологический факультет)

Защита состоится "17 сентя 1995 г.
в 11 час. на заседании диссертационного совета Д 002.85.01 при
Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (117808, Москва,
ул. Вавилова, д. 26)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Автореферат разослан "5" 04 1995 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.М. Протопопова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в товарном рыбоводстве все шире применяются интенсивные методы: выращивание рыб в бассейнах, садках на теплой воде, в установках с замкнутым циклом водоснабжения. В прудовом рыбоводстве также осуществляется переход на интенсивные технологии. Это требует быстрого создания пород рыб, которые в новых условиях обитания способны обеспечить высокую продуктивность. Между тем, селекция рыб, основанная только на традиционных методах, каковыми являются скрещивание и отбор, является весьма длительным и трудоемким процессом. Это связано с тем, что наследуемость признаков продуктивности у карпа и других рыб, объектов товарного выращивания, невелика (Кирпичников, 1987), а смена поколений происходит медленно. Таким образом, одной из важнейших задач сейчас является разработка методов, позволяющих ускорить селекцию рыб, сделать ее более эффективной (Черфас, Цой, 1984; Катасонов, Черфас, 1986; Кирпичников, 1987).

Одним из таких методов может стать индуцированный мутагенез. Мутации, искусственно вызываемые каким-либо агентом (радиационной или химической природы), приводят к увеличению генетического разнообразия в популяции, что позволяет повысить эффективность селекции. Индуцированный мутагенез широко применяется в селекции растений и микроорганизмов, проведены опыты по индуцированному мутагенезу и у некоторых сельскохозяйственных животных. Однако использование метода индуцированного мутагенеза в животноводстве из-за низкой плодовитости большинства сельскохозяйственных животных и их высокой индивидуальной ценности сопряжено с очень большими трудностями. Рыбы же, напротив, отличаются очень высокой плодовитостью, что делает их перспективным объектом мутационной селекции. Кроме того, внешнее оплодотворение значительно облегчает проведение мутагенных воздействий.

Идея использовать индуцированный мутагенез для ускорения селекции рыб принадлежит В.С. Кирпичникову (Кирпичников, 1969; 1987). Р.М. Цой с сотрудниками провели обширные исследования по химическому мутагенезу у нескольких видов рыб (Цой, 1976; 1980; 1985). Было показано, что в потомстве, после обработки спермы алкилирующими агентами, увеличивается изменчивость некоторых селекционно-важных признаков (Цой и др., 1973), а также возрастает частота мутаций маркерных генов (Цой и др., 1974; Цой, Пак, 1986). Полученные данные явились основанием для использования

индуцированного мутагенеза в практической селекции карпа (Цой, 1981; 1983) и белого толстолобика (Цой, Кормилин, 1982).

Однако, несмотря на то, что исследования по мутационной селекции рыб ведутся уже более 20 лет, прямых данных о характере индуцированной изменчивости (то есть, имеет ли она наследуемую составляющую) до сих пор не имеется. Между тем, для заключения об эффективности мутационной селекции этот вопрос имеет принципиальное значение.

Об эффективности коротковолнового ультрафиолета в качестве мутагенного агента, способного повысить изменчивость признаков продуктивности у рыб, практически ничего не известно. Вместе с тем, использование УФ представляет значительный интерес, поскольку спектр повреждений ДНК, возникающих при воздействии УФ, существенно отличается от такового, индуцируемого алкилирующими агентами. Кроме того, в отличие от химических мутагенов, ультрафиолет легко доступен и прост в обращении. Не изучены также эффекты УФ-облучения гамет карпа, особенности их репарации и рыбоводно-биологические свойства УФ-мутагенизированного потомства.

Цели и задачи работы. Цель настоящего исследования заключалась в том, чтобы (1) оценить возможность использования в селекции рыб, направленной на повышение продуктивности, метода индуцированного мутагенеза; (2) изучить эффективность в качестве мутагенного агента коротковолнового УФ-излучения.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучить летальный и цитогенетический эффекты УФ-излучения при воздействии на спермии карпа и найти оптимальные дозы облучения.
2. Изучить особенности репарации УФ-повреждений после облучения гамет карпа.
3. Изучить биологические особенности (в том числе изменчивость по количественным, селекционно-важным признакам) УФ-мутагенизированного потомства карпа первого и второго поколений.
4. Изучить относительный вклад фотореактивируемых (циклобутановые пиримидиновые димеры) и нефотореактивируемых повреждений в мутагенный эффект УФ-излучения у рыб.

Научная новизна. Впервые (на примере карпа) показано, что УФ-облучение спермиев приводит к увеличению в потомстве генотипической изменчивости количественных признаков, в том числе связанных с продуктивностью. Этот результат указывает на

принципиальную возможность использования индуцированного УФ-мутагенеза в селекции рыб, направленной на повышение их продуктивности. Мутагенный эффект УФ-излучения доказан также с помощью трансплантационного теста, проведенного в индивидуальном потомстве серебряного карася гиногенетической формы, полученном после облучения неоплодотворенных яйцеклеток.

Впервые обнаружено, что (1) снижение температуры инкубации оплодотворенных яйцеклеток приводит к увеличению объема фотореактивации УФ-повреждений хромосом спермиев; (2) УФ-облучение неоплодотворенных яйцеклеток вызывает ослабление летального и цитогенетического эффектов УФ-облучения спермиев, которое достигается за счет уменьшения объема репарации цитоплазматических повреждений яйцеклеток. (3) основной вклад в мутагенный эффект УФ-облучения гамет рыб вносят нефотореактивируемые повреждения; (4) в оплодотворенных яйцеклетках рыб имеется кофеин-зависимая система репарации, которая функционирует или до, или во время репликации ДНК.

Впервые у карпа изучены летальный и цитогенетический эффекты УФ-облучения гамет и их модификация при фотореактивации. Обнаружен стимулирующий эффект при УФ-облучении спермиев рыб в малых дозах. Впервые описаны рыбоводно-биологические свойства УФ-мутагенизированного потомства карпа первого и второго поколений.

Практическое значение работы. Разработан метод УФ-индуцированного мутагенеза у карпа, который позволяет увеличить генотипическую изменчивость признаков продуктивности и тем самым повысить эффективность селекции.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на совещании молодых ученых "Методы интенсификации прудового рыбоводства" (пос. Рыбное Московской обл., 1984); Всесоюзном совещании по радиобиологии природных популяций (Сыктывкар, 1985); Третьем всесоюзном совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб (Тарту, 1986); на совместном заседании МО ВОГИС и МОИП (Москва, 1986); межлабораторном семинаре института общей генетики АН СССР (Москва, 1988); на коллоквиумах лаборатории радиационной цитологии института цитологии АН СССР (1984-1988) и лаборатории генетики и селекции рыб ВНИИПРХ (1982-1988).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных 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 стр. машинописного текста, включая 8 рисунков и 25 таблиц. Список литературы включает работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Полевая (прудовая) часть работы выполнена на центральной экспериментальной базе ВНИИ прудового рыбного хозяйства "Якоть" (Дмитровский р-н Московской обл.) в период с мая 1982 по июнь 1988 г.

Материалом для опытов служили:

- половые продукты (икра и сперма), полученные от производителей карпа местного племенного стада. В большинстве случаев использовали производителей среднерусской породной группы карпа (отводки З-НК, загорская, см. Катасонов и др., 1980). В некоторых опытах использовали половые продукты амурского сазана и парского карпа (см. Боброва и др., 1986);

В качестве источника УФ-излучения использовали ртутные бактерицидные лампы БУВ-15 и ДБ-15, большая часть спектра которых (85%) приходится на линию 253.7 нм. Облучение спермы проводили по методике, разработанной для получения индуцированного гиногенеза у карпа (Черкас, Илясова, 1979). Неоплодотворенную икру для облучения размещали в чашке Петри в один слой и заливали овариальной жидкостью или раствором Гольцфретера.

Учет aberrантных анафаз проводили на давленых тотальных прераратах эмбриональных клеток под микроскопом Zeiss (x1350). Зародышей фиксировали по Карнуа на стадии ранней гастролы.

Для достижения фотореактивации использовали или естественное дневное освещение (рассеянный дневной свет у окна в помещении полевой лаборатории), или свет от двух бытовых ламп дневного освещения ЛБ-4. Для исключения фотореактивации осеменение икры проводили при красном свете, а инкубацию эмбрионов до стадии 4 бластомеров - в темной комнате.

При проведении трансплантационного теста пользовались методикой Каллмана и Гордона (Kallman, Gordon, 1957), модифицированной М.И. Абраменко (1985) для карповых рыб. В качестве трансплантата использовали анальный плавник*.

*Пересадки плавников выполнены М.И. Абраменко, за что автор выражает ему искреннюю благодарность.

Статистическую обработку результатов опытов проводили общепринятыми методами (Урбах, 1964).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Эффекты УФ-облучения спермиев карпа.

Летальный эффект. Облучение спермы карпа в большом диапазоне доз (1-200 Дж/м²) не отражается на их оплодотворяющей способности, однако вызывает гибель эмбрионов в ходе инкубации. Среди вылупившихся личинок возрастает доля уродливых особей, большинство из которых погибает в течение первых нескольких дней.

На рис. 1 (кривая 1) показан выход нормальных личинок карпа в зависимости от дозы облучения спермы. Кривая выживаемости имеет характерную S-образную форму. В области малых доз она образует плечо, в диапазоне 2.5-20.0 Дж/м² выход нормальных личинок резко снижается а затем уже меняется мало и составляет 1-5%. Полулетальная доза облучения (рассчитана пробит-методом) для эмбрионального периода развития карпа составляет 6.0 Дж/м².

Цитогенетический эффект. На рис. 2 показано количество aberrантных анафаз в клетках зародышей на стадии ранней гастрুলы при разных дозах облучения спермы. С увеличением дозы облучения количество aberrантных анафаз возрастает, причем эта зависимость хорошо сопряжена с зависимостью доза облучения - выживаемость эмбрионов. Кривая, описывающая выход анафаз, достигает насыщения при дозе 30 Дж/м², при этой же дозе кривая гибели эмбрионов выходит на плато (см. рис. 1). В разных опытах нами исследовано более 500 зародышей, и у всех количество aberrантных анафаз было достоверно выше, чем в контроле. Это указывает на то, что при облучении спермы по принятой нами методике воздействию подвергались практически все спермии.

Стимулирующий эффект. При облучении спермы в малых дозах (0.3-0.8 Дж/м²) выявлен стимулирующий эффект облучения. Стимулирующий эффект выразался в увеличении по сравнению с контролем выживаемости эмбрионов и более раннем и дружном вылуплении личинок. Наиболее четко стимулирующий эффект проявлялся при использовании икры невысокого рыбоводного качества. Когда же выживаемость эмбрионов в контроле была достаточно высока, эффект стимуляции был выражен слабее или вообще не проявлялся. Последнее обстоятельство ограничивает использование данного эффекта в практике рыбоводства.

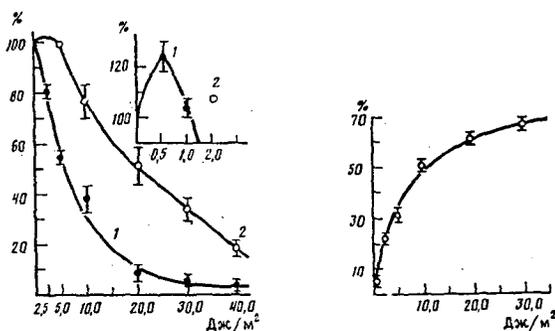


Рис 1. Выживаемость эмбрионов карпа в зависимости от дозы облучения спермиев и условий освещенности оплодотворенных яйцеклеток.

1 - инкубация эмбрионов в темноте; 2 - инкубация эмбрионов на свету.

По оси абсцисс - дозы УФ-облучения спермы, Дж/м²;

по оси ординат - количество нормальных личинок, % от числа оплодотворенных яиц.

Рис. 2. Количество aberrантных анафаз у эмбрионов карпа в зависимости от дозы облучения спермы.

По оси абсцисс - дозы облучения спермы, Дж/м²;

По оси ординат - количество aberrантных анафаз в среднем на одного зародыша (%).

Обсуждение. Кривая доза облучения - выживаемость эмбрионов имеет типичную для такого рода кривых S-образную форму. Обычно плечо в области малых доз объясняют действием репаративных систем, работа которых при небольшом числе индуцированных повреждений наиболее эффективна. Экспоненциальный участок кривой связан с быстрым накоплением летальных повреждений (это хорошо видно на рис. 2, показывающем выход aberrантных анафаз), когда репаративные системы уже не способны их устранять.

Полулетальная доза облучения для эмбрионального периода развития карпа по нашим данным составляет 6.0 Дж/м². По расчетам Р.М. Цой и С.Ф. Шустовой (Цой, Шустова, 1980) LD₅₀ для карпа на первом году жизни составляет 13.5 Дж/м². Однако из результатов самих авторов следует, что это значение ошибочно, так как уже

наименьшая из испытанных ими доз (8.5 Дж/м²) вызвала гибель более 70% эмбрионов.

По-видимому, основной причиной гибели эмбрионов в результате УФ-облучения являются хромосомные aberrации. Известно (Griggs, Bender, 1973), что первичным УФ-повреждением, вызывающим перестройки хромосом, являются пиримидиновые димеры.

Наряду с поражающим эффектом УФ в высоких дозах, выявлен стимулирующий эффект УФ-света в малых дозах, лежащих в области 0.5-0.8 Дж/м². Ранее стимулирующий эффект был обнаружен при воздействии на спермии рыб как ионизирующей радиации (McGregor, Newcombe, 1972; Вакон et al., 1980), так и алкилирующих агентов (Жуковская и др., 1973; Цой, Мусина, 1980). В наших опытах было установлено, что при фотореактивации стимулирующая доза облучения увеличивается до 2.5 Дж/м². Таким образом, механизм стимулирующего действия УФ связан, по-видимому, с образованием в ДНК хромосом спермиев пиримидиновых димеров.

Фотореактивация.

Хорошо известно, как значительно эффекты УФ облучения, в том числе и УФ-облучения гамет и эмбрионов рыб, могут модифицироваться с помощью фотореактивации. В этой связи изучению фотореактивации после УФ-облучения гамет (яйцеклеток и сперматозоидов) карпа было уделено нами большое внимание. В первых опытах было показано, что непосредственно в спермиях фотореактивации не происходит, а в неоплодотворенных яйцеклетках ее объем невелик.

Фотореактивация УФ-повреждений спермиев в яйцеклетках после осеменения. Для изучения возможности фотореактивации УФ-повреждений спермиев после оплодотворения осемененные облученной спермой яйцеклетки освещали видимым светом в течение 1-1.5 час от момента осеменения. На рис. 1 показан выход личинок карпа в зависимости от дозы облучения спермы и освещенности оплодотворенных яйцеклеток. При воздействии видимым светом выживаемость эмбрионов резко возрастает. Видно, что стимулирующая доза возрастает до 2.5 Дж/м², а LD₅₀ - до 23.5 Дж/м².

Скорость процессов, происходящих при оплодотворении зависит от температуры. Поэтому фактором, определяющим объем репарации может быть не только освещенность, но и температура. В связи с этим было поставлено несколько опытов по определению величины фотореактивации в зависимости от температуры инкубации эмбрионов.

Осемененную облученной спермой икру разделяли на четыре порции и инкубировали в темноте или на свету при температуре 18 или 25°C. Различия в условиях сохраняли до начала дробления эмбрионов, дальнейшую инкубацию во всех вариантах проводили при 23°C и естественном освещении. Контролем служили эмбрионы, развивающиеся после осеменения икры необлученной спермой. Условия начального периода инкубации контрольных партий зародышей были аналогичны опытным.

Результаты опытов представлены в табл. 1. В темноте эффект облучения при разных температурах был одинаковым. При инкубации зародышей на свету снижение температуры с 25 до 18°C привело к достоверному ослаблению эффекта облучения.

Таблица 1.

Эффект УФ-облучения спермиев карпа в зависимости от условий инкубации эмбрионов.

Доза облучения спермы, Дл/м ²	Условия инкубации: температура и освещение	Число эмбрионов, шт.	Выход нормальных личинок		Цитогенетический анализ		
			шт.	(Р±σ), %	исследовано зародышей, шт.	% aberrантных анафаз на 1 зародыша, К _т ±σ	С. V.
15	18°, свет	1337	1009	75.5±1.2	9	15.8±1.1	28.7
	18°, темнота	1482	312	21.5±1.1	14	39.2±2.2	20.9
	25°, свет	1369	933	68.2±1.3	15	32.3±3.5	41.7
	25°, темнота	933	192	20.6±1.3	15	41.0±2.2	20.7
30	18°, свет	1228	401	32.7±1.3	15	38.7±1.9	18.9
	18°, темнота	947	23	2.4±0.5	14	66.0±0.9	5.3
	25°, свет	1010	116	11.5±1.0	14	46.2±2.0	14.6
	25°, темнота	967	29	3.0±0.5	14	66.2±1.1	6.3
0	Среднее* по всем контрольным вариантам	2725	2467	90.5±0.6	9	3.9±0.9	71.4

*Различий по выживаемости эмбрионов и числу aberrантных анафаз между контрольными вариантами не было.

Эффективный период действия фотореактивации. Эффективный период действия фотореактивации, как известно, практически полностью ограничен временем до начала первой пострадиационной репликации ДНК. Для выяснения продолжительности действия ФР в

оплодотворенных яйцеклетках карпа весь период развития зародышей от осеменения до начала дробления разбили на 10-минутные интервалы. Разные партии эмбрионов, полученных после облучения спермы УФ в дозе 30 Дж/м², освещали видимым светом в один из этих промежутков времени. Контролем служили эмбрионы, развитие которых до начала дробления проходило в темноте. Температура воды в данном опыте составляла 20°C.

Резкое падение выживаемости отмечено в варианте с освещением эмбрионов с 20 по 30 мин после осеменения. При освещении в более поздние сроки выживаемость опытных эмбрионов не отличалась достоверно от выживаемости в контроле. Таким образом, эффективный период действия фотореактивации составляет примерно 0.8 т_с после осеменения (продолжительность 1 митотического цикла у карпа в период синхронного дробления эмбрионов при температуре 20°C составляет 28 мин (Игнатъева, 1974)).

Обсуждение. Проведенные нами опыты показали, что повреждения, индуцированные УФ в спермиях карпа, могут быть ликвидированы при освещении оплодотворенных яйцеклеток видимым светом. Известны два основных механизма восстановления от УФ-повреждений с помощью видимого света - энзиматическая фотореактивация и фотозащита. Очевидно, что в данном случае мы имеем дело именно с фотореактивацией, поскольку фотозащита имеет место в случае цитостатического эффекта видимого света. В наших опытах был использован рассеянный дневной свет, воздействию которым эмбрионы подвергаются и в естественных условиях. Понятно, что замедления скорости развития при этом мы не наблюдали.

Ранее фотореактивация УФ-повреждений спермиев в процессе инкубации оплодотворенных яйцеклеток была обнаружена у медаки (Ijiri, 1980.; Ijiri, Egami, 1980). Чувствительность к УФ и величина фотореактивации у карпа и медаки оказались практически одинаковыми.

Нами показано также, что количество фотореактивированных повреждений увеличивается при снижении температуры инкубации с 25 до 18°C. Известно, что УФ-индуцированные повреждения фиксируются уже в процессе первой пострadiационной репликации ДНК. Поэтому объем фотореактивации определяется продолжительностью периода от осеменения яйцеклеток облученной спермой и до начала синтеза ДНК в мужском пронуклеусе. Используемые в опытах температуры (18 и 25°C) являются нормальными нерестовыми для карпа (Игнатъева, 1974), однако время до начала дробления (а следовательно, и

продолжительность дорепликативного периода) при этих температурах различаются вдвое (Игнатьева, 1974). Конечно, температура влияет на скорость фотореактивации, определяя время образования фермент-субстратного комплекса (Harm, 1975), однако, как следует из полученных нами результатов, изменение активности фотоллазы в исследованном температурном диапазоне невелико. На культуре клеток серебряного карася САФ-ММ1 показано, что при уменьшении температуры инкубации с 26 до 20°C эффективный период действия фотореактивации увеличивается в два раза (Mano et al., 1982).

Первая репликация ДНК у зародышей животных, в том числе рыб, начинается через некоторое время после проникновения спермия в яйцеклетку, еще в период сближения или слияния пронуклеусов (Гинзбург, 1968). Эффективный период действия ФР в оплодотворенных яйцеклетках карпа при 20°C составил примерно 25 мин (0.8 t_0) после осеменения. По-видимому, именно в это время начинается первый синтез ДНК мужских хромосом карпа. Хронологически этот период соответствует контакту пронуклеусов при оплодотворении у карпа (Алатсей, 1985).

При инкубации оплодотворенных яйцеклеток в темноте различие в температурах не отразилось на эффекте облучения. Таким образом, действия эксцизионной или каких либо других систем репарации выявлено не было. Нельзя, однако, на основании полученных нами данных сделать вывод об отсутствии у ранних эмбрионов карпа дорепликативных систем репарации. Снижение температуры, с помощью которого было достигнуто удлинение дорепликативного периода, могло вызвать адекватное уменьшение активности репарационных ферментов. В случае с фотоллазой этого не произошло, но другие ферменты могли оказаться более чувствительными к изменению температуры.

Модификация эффектов УЧ-облучения спермиев карпа.

Как было показано в предыдущем разделе, при удлинении у ранних эмбрионов карпа дорепликативного периода с помощью снижения температуры инкубации обнаружить работу темновых дорепликативных систем репарации не удалось. В настоящем разделе описываются результаты опытов, в которых была предпринята попытка изучить репарацию у зародышей карпа с помощью других методов: воздействием кофенсина в комбинации с облучением как спермиев, так и оплодотворенных яйцеклеток.

Влияние кофеина. Опыты проводили по следующей методике. Эмбрионов помещали в 0.1% раствор кофеина через 0.2 или 1.0 т₀ после осеменения. Как было показано выше, первый синтез ДНК в мужском пронуклеусе осуществляется примерно через 0.8 т₀ после осеменения. Таким образом, в первом случае воздействию кофеином подвергались как до-, так и пострепликативный периоды, а во втором - только пострепликативный. Интервал в 0.2 т₀ от осеменения был предусмотрен для того, чтобы избежать возможных различий в проницаемости кофеина через оболочки набухшей и ненабухшей икры. Инкубацию с кофеином продолжали до стадии 4-6 бластомеров. До этого же времени, чтобы исключить фотореактивацию, инкубацию проводили в темноте. Затем эмбрионов несколько раз промывали чистой водой и продолжали инкубацию в обычных условиях. В предварительных опытах было установлено, что кофеин в концентрации 0.1% не оказывает на эмбрионов карпа токсического действия.

Опыты показали, что усиление летального и цитогенетического эффектов облучения имело место только в том случае, когда эмбрионов помещали в раствор кофеина еще до начала первой пострадиционной репликации ДНК. Данные, полученные нами, можно объяснить наличием в оплодотворенных яйцеклетках карпа кофеин-зависимой системы репарации, которая функционирует или до, или во время репликации ДНК.

Ослабление эффекта УФ-облучения спермиев карпа в результате УФ-облучения неоплодотворенных яйцеклеток. В работе, изложенной в данном разделе, мы исследовали изменение летального и цитогенетического эффектов УФ-облучения спермиев карпа при облучении неоплодотворенных яйцеклеток. Идея постановки таких опытов возникла по ассоциации с реактивацией Вейгла.

Обобщенные результаты всех опытов представлены в табл. 2, из которой хорошо видна и схема опытов: контролем для вариантов, в которых облучению подвергали икру, и сперму, служили варианты, в которых облучали гаметы только какого-либо одного типа. Величины ожидаемой выживаемости и ожидаемой гибели эмбрионов, развивающихся после облучения как спермиев, так и яйцеклеток, рассчитывали по формуле полной вероятности события исходя из предположения о независимости эффектов облучения гамет. При этом использовали данные контрольных вариантов.

Выживаемость эмбрионов после облучения как спермиев, так и яйцеклеток оказалась выше теоретически ожидаемой. Количество aberrантных анафаз у эмбрионов в этих вариантах опыта было ниже,

чем в варианте с облучением только спермиев. Таким образом, облучение и яйцеклеток, и спермиев приводит к ослаблению аддитивного поражающего эффекта.

Таблица 2.

Летальный и цитогенетический эффекты УФ-облучения спермиев и яйцеклеток карпа

Доза облучения спермиев, Дл/м ²	Доза облучения икры, Дл/м ²	Число опытов	Доля нормальных личинок, % (I _{нж}), X		Число исследованных зародышей, шт.	Количество аберраций, % (I _{абн}), X
			фактическая	ожидаемая		
0	0	13	87.9±2.3		17	7.5±0.6
	2.5	14	81.5±2.5		7	8.7±0.2
	5.0	14	74.0±2.9		7	7.7±0.8
	10.0	14	50.7±1.9		7	12.6±1.0
5.0	0	8	59.8±4.0		31	27.5±1.6
	2.5	8	60.0±4.7	55.4±4.3	28	23.1±1.5 ^б
	5.0	8	61.6±5.4	50.4±4.1	21	19.7±1.3 ^б
	10.0	8	45.0±3.9	34.5±2.8	23	23.5±1.1 ^б
10.0	0	9	28.5±3.1			
	2.5	9	29.3±3.0	26.4±3.1		
	5.0	9	31.7±3.2	24.0±2.8		
	10.0	9	28.1±2.4 ^б	16.4±2.0		
15.0	0	1	21.5		14	62.1±1.4
	2.5	1	24.9	19.9	5	61.8±3.0
	5.0	1	20.4	18.1	15	53.3±1.7 ^б
	10.0	1	22.2 ^а	12.4	10	59.9±2.0

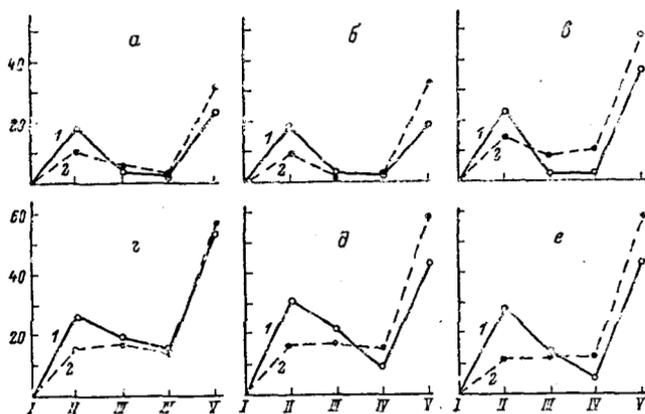
^а Достоверно отличается от ожидаемой доли (оценка с помощью критерия X², P<0.01). ^б Достоверно

отличается от соответствующего значения в варианте с отсутствием облучения икры (оценка с помощью t-критерия, ^б P<0.05; ^в P<0.01).

В одном из опытов была прослежена динамика гибели эмбрионов в ходе их развития (рис. 3). Оказалось, что на ранних этапах развития гибель эмбрионов значительно выше теоретически ожидаемой, а на заключительных, наоборот, существенно ниже ее. Подобная картина имеет место даже при облучении яйцеклеток в дозе 2.5 Дл/м², которая сама по себе практически не влияет на выживаемость зародышей. Именно снижение гибели на завершающих стадиях эмбриогенеза и приводит в итоге к ослаблению аддитивного летального эффекта облучения гамет. Степень ослабления значительно

уменьшается из-за неожиданного повышения гибели на ранних стадиях эмбриогенеза.

В специально проведенных наблюдениях за началом дробления зародышей установлено, что у эмбрионов из всех вариантов опыта борозда первого деления дробления появляется одновременно. Таким образом, задержки начала дробления в результате облучения яйцеклеток и (или) спермиев не происходит.



Фиг. 3. Фактическая (1) и ожидаемая (2) динамика гибели эмбрионов, развивающихся после облучения и спермиев, и неоплодотворенных яйцеклеток.

По оси абсцисс - стадии эмбриогенеза: I - оплодотворение; II - закладка сомитов; III - подвижный эмбрион; IV - пигментация глаз; V - свободный эмбрион.

По оси ординат - доля погибших эмбрионов, % от числа эмбрионов, живых на предыдущей стадии.

Дозы облучения (Дж/м²) яйцеклеток и спермиев соответственно: а - 2.5+5.0; б - 5.0+5.0; в - 10.0+5.0; г - 2.5+10.0; д - 5.0+10.0; е - 10.0+10.0.

Обсуждение. Каким образом облучение яйцеклеток может привести к ослаблению эффекта облучения спермиев? Самое простое объяснение заключается в том, что облучение яйцеклеток, оказывая цитостатический эффект, приводит к удлинению периода до начала первой пострadiационной репликации ДНК и соответственно к

увеличению времени работы дорепликативных систем репарации. Однако этому предположению противоречат данные наблюдений за началом дробления эмбрионов. Одновременное появление борозды первого деления у эмбрионов во всех вариантах опыта свидетельствует о том, что облучение яйцеклеток не изменяет продолжительности дорепликативного периода.

Ослабление эффекта облучения спермиев может быть достигнуто за счет улучшения работы репаративных систем яйцеклеток в ответ на возникновение в них УФ-повреждений. Возможны два механизма увеличения объема репарации: 1) повреждения в яйцеклетках являются сигналом к включению индуцибельной системы репарации; 2) повреждения в яйцеклетках приводят к увеличению активности ферментов конститутивных систем репарации.

Первый из этих возможных механизмов при реализации в системе "облученный спермий - облученная яйцеклетка" должен встретить определенные трудности. Как известно, работа индуцибельных систем репарации начинается с дерепрессии генов, белковые продукты которых участвуют в исправлении повреждений. Однако именно на ранних стадиях развития, вплоть до стадии бластулы, транскрипции ДНК у рыб не происходит (Игнатьева, Ротт, 1970; Кафиани, Костомарова, 1978). Кроме того, промежуток времени от начала облучения яйцеклеток до их осеменения был очень коротким (менее 1 мин.). Облученные мужские хромосомы, попав в цитоплазму яйцеклетки, сами могут индуцировать работу репаративных систем. Таким образом, механизм, обеспечивающий ослабление эффектов облучения спермиев, начинает действовать немедленно, иначе мы бы просто не смогли обнаружить его работу. В этой связи очевидно, что если облучение яйцеклеток и вызывает индукцию репаративных ферментов, то на уровне трансляции, но не транскрипции. Второй возможный механизм предусматривает активацию в яйцеклетках конститутивных ферментов дорепликативной репарации. Регуляция активности ферментов по принципу обратной связи имеет универсальный характер (Страйер, 1984), поэтому существование такого механизма применительно к репаративным ферментам яйцеклетки кажется вполне правдоподобным.

Анализ динамики гибели эмбрионов показывает, что взаимодействие облученных гамет имеет сложный характер. Ослабление эффекта облучения спермиев выражается в значительном снижении смертности зародышей на заключительных стадиях развития. Однако в

начале эмбриогенеза гибель зародышей существенно превышает ожидаемую (рис. 3).

Резкое повышение гибели ранних зародышей, развивающихся после облучения и спермиев, и яйцеклеток (по нашим наблюдениям, оно начинается уже во время синхронных делений), очевидно, обусловлено цитоплазматическими повреждениями и не связано с возникновением дополнительных повреждений в хромосомах. Во-первых, количество aberrантных митозов при этом не возрастает, а даже, наоборот, уменьшается. Во-вторых, летальные повреждения в хромосомах могут быть реализованы только начиная со стадии гаструлы (Нейфах, 1959.) и, как хорошо видно по вариантам опыта с облучением только спермы, вызывают гибель прежде всего в конце эмбриогенеза.

Таким образом, репарация повреждений хромосом спермиев, которая усиливается при облучении яйцеклеток, достигается в ущерб исправлению цитоплазматических повреждений в самих яйцеклетках. Объяснить этот факт можно, если предположить, что репарация ДНК хромосом и повреждений цитоплазмы (по-видимому, это повреждения мРНК) осуществляется одной и той же репаративной системой. При этом также следует допустить, что репарации ДНК отдается предпочтение.

Рыбоводно-биологическая характеристика мутагенизированных потомств карпа первого и второго поколений

Рыбоводная характеристика. Для получения мутагенизированных потомств сперму облучали Уф, в дозе 5.5 Дж/м². Инкубацию эмбрионов проводили в аппаратах Вейса, в условиях, исключающих фотореактивацию. Одновременно с мутагенизированными, используя тех же производителей, получали соответствующие контрольные потомства (К₁). При получении М₂ сперму не облучали.

Мутагенное воздействие вызвало значительную гибель эмбрионов. Повышенные отходы наблюдались и у опытных личинок в первые дни после вылупления. Доля уродливых особей среди сеголетков М₁ была достоверно выше. Наиболее часто встречались уродства головы, искривления рта и позвоночника. При выращивании двухлетков и рыб более старшего возраста существенных различий между потомствами М₁ и К₁ не наблюдалось ни по скорости роста, ни по выживаемости.

Показатели воспроизводительной способности у самцов и самок М₁ оказались не хуже, а в некоторых случаях даже выше, чем у производителей К₁.

При исследовании M_2 установлено, что в эмбриогенезе жизнеспособность мутагенизированного потомства снижена по сравнению с контролем на 7%, в дальнейшем различий по выживаемости и скорости роста не наблюдалось.

Изменчивость количественных признаков. Облучение спермиев карпа в дозе 5.5 Дж/м² привело к увеличению изменчивости личинок и сеголетков по ряду количественных признаков, в том числе по таким важным с селекционной точки зрения, как вес и длина. Повышенная изменчивость сохранилась и во втором поколении (табл. 3 и 4).

Анализ изменчивости был проведен также среди сеголетков, полученных от скрещивания самцов M_1 и K_1 с одной неродственной самкой. Опытных и контрольных рыб выращивали отдельно с трехкратной повторностью. И в этом случае обнаружено достоверное увеличение изменчивости некоторых признаков в "полумутагенизированном" потомстве.

Таблица 3
Межсемейная изменчивость некоторых пластических признаков у личинок M_2 и K_2 .

Признак	K_2	M_2	t-критерий различия по C.V.
	$\bar{C.V.} \pm \bar{Sc.v.}$	$\bar{C.V.} \pm \bar{Sc.v.}$	
Максимальная длина тела	0.88±0.11	1.77±0.11	5.72
Длина тела до окончания позвоночника	0.99±0.09	1.93±0.15	5.37
Длина головы	1.34±0.18	1.77±0.29	1.26
Высота тела	1.84±0.29	3.42±0.47	2.86
Длина тела до анального отверстия	1.02±0.06	1.67±0.16	3.80

Примечание. В таблице представлены средние коэффициенты вариации семей M_2 ($n = 15$) и K_2 ($n = 20$) по ряду признаков.

Обсуждение. Таким образом, УФ-облучение спермид приводит к увеличению изменчивости количественных признаков у личинок и сеголетков карпа в первом поколении.

Таблица 4

Сравнение изменчивости сеголетков М₂ и К₂
по критериям Стьюдента и Фишера

Признак	Средние коэффициенты вариации			Дисперсия		
	$\bar{C.V.}_M$	$\bar{C.V.}_K$	t	$\bar{\sigma}_M^2$	$\bar{\sigma}_K^2$	F
Масса	21.7±0.59	17.8±1.15	3.02	639.59	383.22	1.67
Длина	7.6±0.18	6.1±0.43	3.21	129.16	83.42	1.51
Высота	9.4±0.49	7.3±0.53	2.91	27.74	17.64	1.57
Длина головы	7.7±0.26	6.4±0.35	2.98	12.72	9.00	1.41
Масса/Длина	15.9±0.70	12.5±1.11	2.59	13.6*10 ⁻³	8.7*10 ⁻³	1.56

Примечание. Сеголетков выращивали в прудах при отдельной посадке с трехкратной повторностью. Из каждого пруда было измерено по 100 рыб.

Критические значения для критерия Стьюдента (f=4): $t_{05}=2.78$; для критерия Фишера: $F_{05}=1.26$, $F_{01}=1.39$.

$\bar{C.V.}_M$ и $\bar{C.V.}_K$ представляют собой средние арифметические коэффициентов вариации признаков у сеголетков М₂ и К₂ из трех выборок каждого потомства; $\bar{\sigma}_M^2$ и $\bar{\sigma}_K^2$ - дисперсии признаков сеголетков М₂ и К₂ из объединенных выборок.

Ответ на вопрос, имеет ли изменчивость, индуцированная мутагенами, наследуемую составляющую может дать анализ рыб второго поколения. Как показывают наши данные, изменчивость и личинок, и сеголетков М₂, а также полумутагенизированных сеголетков достоверно выше изменчивости в контроле.

Важно отметить, что индуцированная изменчивость личинок М₂ оказалась значительно выше, чем изменчивость у сеголетков. Это связано с тем, что у личинок определяли уровень межсемейной изменчивости, а при анализе сеголетков использовали смесь рыб из 25 семей. Между тем повышенная изменчивость в М₂ определяется прежде всего межсемейной вариацией, а не внутрисемейной. Ведь члены одной семьи должны иметь сходный состав мутантных генов, который в разных семьях, конечно, может быть различным. Таким образом, вполне вероятно, что анализ межсемейной изменчивости у сеголетков обнаружит еще больший уровень индуцированной изменчивости, чем у личинок, поскольку количество

экспрессированных генов с возрастом увеличивается. Повышение именно межсемейной изменчивости указывает, что наиболее эффективным методом мутационной селекции должен быть отбор между семьями.

Сохранение повышенной изменчивости у мутагенизированных рыб второго поколения доказывает, что УФ-индуцированная изменчивость количественных, селекционно важных признаков имеет наследственный характер. Это позволяет сделать положительный вывод о возможности использования индуцированного мутагенеза в селекции рыб.

Изучение вклада фотореактивируемых и нефотореактивируемых повреждений в мутагенный эффект УФ-облучения.

В настоящем разделе нами была предпринята попытка изучить относительный вклад фотореактивируемых (пиримидиновые димеры) и нефотореактивируемых повреждений в мутагенный эффект УФ-облучения гамет рыб. Для решения поставленной задачи было проведено два опыта. В первом из них с помощью трансплантационного теста оценивали частоту мутаций генов гистосовместимости у сеголетков серебряного карася триплоидной гиногенетической формы. Во втором опыте вклад фотореактивируемых и нефотореактивируемых повреждений в мутагенный эффект УФ-облучения оценивали по уровню индуцированной изменчивости количественных признаков у личинок карпа.

Опыт с серебряным карасем. Серебряный карась (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) однополый триплоидной формы размножается путем амеиотического гиногенеза (Черкас, 1966; 1969). Созревание половых клеток у самок однополый формы по амеиотическому типу приводит к тому, что потомство каждой гиногенетической самки представляет собой клон, генетически тождественный материнской форме. Это, в частности, было доказано с помощью трансплантационного теста, где в качестве трансплантата использовался анальный плавник (Абраменко, 1984). Трансплантационный тест позволяет выявлять различия между донором и реципиентом по генам гистосовместимости.

Икру, полученную от одной самки серебряного карася разделили на три порции, одну из которых, не подвергая обработке УФ, использовали в качестве контроля. Две другие порции подвергли УФ-облучению в дозе 100 Дж/м². После этого контрольную и опытные партии икры осеменили спермой карпа. Одну из опытных партий эмбрионов в первые 1,5-2 часа после осеменения инкубировали на свету, а другую, для исключения фотореактивации, в темноте.

Полученных личинок высадили в пруды на выращивание. После осеннего облова сеголетков в условиях аквариальной подвергли трансплантационному тесту. В контроле проводили реципрокные пересадки плавника между особями только данной группы, а плавники рыб из опытных групп пересаживали реципиентам, взятым из контрольной группы.

Облучение неоплодотворенной икры УФ-светом привело к снижению выживаемости эмбрионов и увеличению числа aberrантных анафаз (табл. 5). Освещение ранних эмбрионов достоверно ослабило как летальный, так и цитогенетический эффекты облучения.

Таблица 5

Результаты инкубации и количество aberrантных анафаз у серебряного карася гиногенетической формы в зависимости от облучения неоплодотворенной икры и освещенности ранних эмбрионов.

Вариант опыта	Результаты инкубации		Цитогенетический анализ	
	число эмбрионов, шт.	вылупилось нормальных личинок шт (P±5%), %	исследовано за-родышей, шт.	% aberrантных анафаз в среднем на 1 зародыша, X±s
100 Дл/м ²	594	196 32.8±1.93	5	45.6±2.30
100 Дл/м ² + ФР	633	292 46.1±1.98	5	29.1±2.37
Контроль	737	584 78.5±1.56	5	10.2±1.24

Таблица 6

Результаты трансплантационного теста у сеголетков серебряного карася гиногенетической формы

Вариант опыта	число рыб в опыте, шт.	Количество прививаемых трансплантатов		Среднее время отторжения трансплантата, сут.	
		шт	(P±5%), %	X±s	C.V.
100 Дл/м ²	31	18	28.8±5.7	15.6±0.6	25.0
100 Дл/м ² + ФР	100	23	23.0±1.2	15.2±0.5	27.4
Контроль	10	20	32.0±0.9	16.3±0.8	25.4

Результаты опыта по пересадке плавников представлены в табл. 6. Как в контрольном, так и в опытных вариантах наряду с приживлением наблюдали отторжение трансплантатов у части рыб. Облучение неоплодотворенной икры привело к достоверному увеличению количества рыб, отторгнувших трансплантат и сокращению времени выживания трансплантатов у реципиентов. Освещение ранних эмбрионов видимым светом не повлияло на частоту приживления.

Влияние фотореактивации на величину УФ-индуцированной изменчивости личинок карпа. Икру, полученную от одной самки карпа разделили на три порции и осеменили смесью спермы самцов амурского сазана. В контрольном варианте (вариант "К") икру осеменили интактной (необлученной) спермой. В одном из опытных вариантов для осеменения использовали сперму, облученную Уф в дозе 5.5 Дж/м², начальный период инкубации эмбрионов провели в темноте (вариант "Уф"). Во втором опытном варианте (вариант "Уф+ФР") использовали сперму, облученную в дозе 22 Дж/м², в первые два часа после осеменения эмбрионов освещали видимым светом.

Результаты инкубации контрольного и опытных потомств представлены в табл. 7.

Полученные потомства выращивали сначала в прудах, а затем в аквариальной. Весной следующего года достигших половозрелости самцов, принадлежащих ко всем трем группам, скрестили с одной неродственной самкой. Личинок из полученных индивидуальных потомств подвергли биометрическому анализу. Из каждого потомства измеряли по 50 личинок, в качестве характеристики потомства использовали средние арифметические значения признаков.

Таблица 7

Результаты инкубации эмбрионов карпа, полученных при разных условиях освещенности и облучении спермы в разных дозах.

Вариант опыта (доза облучения и освещенность)	Число эмбрионов, шт.	Вылупилось нормальных личинок	
		шт.	%
5.5 Дж/м ²	309	112	36.2
22.0 Дж/м ² + ФР	854	761	89.4
Контроль	571	562	98.4

Таблица 8

Межсемейная изменчивость (дисперсии средних арифметических значений признаков) личинок карпа из индивидуальных потомств, полученных от скрещивания мутагенизированных самцов с одной неродственной самкой.

Признак	Дисперсия			Отношение дисперсий		
	УФ	УФ+ФР	К	УФ/К	УФ+ФР/К	УФ+ФР/УФ
Максимальная длина тела	6.91	9.85	4.79	1.44	2.06	1.43
Длина тела до окончания позвоночника	6.66	11.39	4.52	1.47	2.52	1.71
Длина головы	0.95	1.38	0.54	1.76	2.56	1.45
Высота тела	0.15	0.22	0.24	0.63	0.92	1.47
Длина тела до анального отверстия	4.16	7.28	1.85	2.25	3.94*	1.75

Примечание. *Различие дисперсий достоверно по критерию Фишера при $P < 0.5$.

Уровень межсемейной изменчивости в потомствах мутагенизированных самцов по четырем из пяти исследованных признаков оказался несколько выше, чем в потомствах интактных самцов, причем во всех случаях изменчивость в потомствах самцов из варианта "УФ+ФР" была на 40-70% выше, чем изменчивость в потомствах самцов из варианта "УФ" (табл. 8).

Обсуждение. Облучение неоплодотворенных яйцеклеток серебряного карася гиногенетической формы вызвало снижение выживаемости эмбрионов и увеличение частоты аберрантных анафаз в клетках гастрюлы. Оба эти эффекта были существенно ослаблены при освещении ранних эмбрионов видимым светом, очевидно, за счет фотореактивации пиримидиновых димеров. Поскольку в данном опыте облучению подвергали яйцеклетки, то увеличение выживаемости эмбрионов в варианте с освещением могло быть обусловлено фотореактивацией димеров, индуцированных как в ДНК хромосом, так и в нуклеиновых кислотах цитоплазмы. Однако как показывают данные цитогенетического анализа, по меньшей мере в ДНК хромосом яйцеклеток часть димеров была фотореактивирована.

Пересадки анального плавника у сеголетков показали, что как в контрольном, так и в опытных вариантах наряду с приживлением у части рыб имело место отторжение трансплантатов. Облучение неоплодотворенной икры привело к достоверному увеличению количества рыб, отторгнувших трансплантат и сокращению времени выживания трансплантатов у реципиентов. Частота отторжения трансплантатов оказалась примерно одинаковой в обоих опытных вариантах, таким образом, освещение эмбрионов УФ-светом не повлияло на степень гистосовместимости. Величину индуцированного (вызванного только за счет облучения) отторжения трансплантата можно рассчитать по результатам пересадок в контрольном и опытном вариантах, в варианте с исключением фотореактивации она составила 0.25.

Как известно, трансплантационный тест устанавливает сходство и различие между донором и реципиентом по генам тканевой совместимости. Приживление трансплантата возможно только в случае полной тождественности донора и реципиента по всем генам гистосовместимости, наличие различий хотя бы по одному из генов (имеются в виду так называемые "сильные" гены) приводит к отторжению.

Индуцированные отторжения трансплантата в нашем опыте произошли вследствие возникновения мутаций генов тканевой совместимости. Особенность проведения пересадок (от УФ-облученных доноров на интактных реципиентах) исключила в данном случае отторжение плавников за счет индуцированных делеций. Это дает возможность приблизительно определить частоту индуцированных мутаций генов гистосовместимости.

Допустим, что вероятность возникновения мутаций вследствие УФ-облучения одинакова для всех генов гистосовместимости и равна P_1 . Обозначим общее число таких генов как N . Частота приживления трансплантатов ($P_{пр}$) равна вероятности того, что наугад взятая рыба из опытного варианта не имеет ни одной индуцированной мутации ни по одному гену гистосовместимости:

$$P_{пр} = (1 - P_1)^N,$$

а индуцированная частота отторжения ($P_{от}$), которая в нашем опыте составила 0.25, соответственно будет равна вероятности события, которое заключается в том, что наугад взятая рыба будет иметь хотя бы один мутантный ген гистосовместимости:

$$P_{от} = 1 - (1 - P_1)^N$$

(1)

Количество генов гистосовместимости у серебряного карася неизвестно. Однако у достаточно близкого вида, карпа, число генов гистосовместимости составляет приблизительно 32 (Абраменко, Рёкубратский, 1987), или на один генем - 16. Если допустить, что у карпа и карася количество генов тканевой совместимости в расчете на один генем одинаково, то в триплоидном наборе хромосом гиногенетической формы серебряного карася должно быть 48 генов. Подставляя это значение в формулу (1), получим, что в результате УФ-облучения яйцеклеток частота индуцированных мутаций генов гистосовместимости P_1 составила 6×10^{-3} . Эта величина приблизительно соответствует частоте мутаций генов чешуйного покрова у карпа, индуцированных с помощью алкилирующих соединений (Цой, 1971; Цой и др., 1974).

Количество aberrаций хромосом, индуцированных УФ-облучением яйцеклеток серебряного карася значительно уменьшилось за счет фотореактивации. Однако частота отторжения трансплантатов при этом не изменилась. Это говорит о том, что основными фотопродуктами, вызвавшими мутации генов гистосовместимости, являются не цикlobутановые пиримидиновые димеры, а другие, нефотореактивируемые повреждения ДНК. Согласно современным представлениям, мутагенный эффект коротковолнового УФ у эукариотов прежде всего обусловлен индукцией в ДНК (6-4)-фотопродуктов и пиримидиновых димеров (Boure et al., 1986; Brash, 1988), причем в некоторых случаях (6-4)-фотопродукты являются главным предмутационным повреждением (Zdzienicka et al., 1992; Sage, 1993). Как известно, (6-4)-фотопродукты не фотореактивируются, а их относительный выход возрастает при высоких дозах УФ (Mitchell, Nairn, 1989).

Вывод, сделанный нами на основании результатов опыта с гиногенетической формой серебряного карася подтвердился в опыте по изучению влияния фотореактивации на индуцированную изменчивость личинок карпа. Выживаемость эмбрионов в варианте с облучением спермиев в дозе 22.0 Дж/м^2 и освещением эмбрионов оказалась существенно выше выживаемости эмбрионов в варианте с облучением спермиев в дозе 5.5 Дж/м^2 и исключением фотореактивации (см. табл. 7). Это указывает на то, что количество пиримидиновых димеров у

эмбрионов из первого опытного варианта было значительно ниже, чем у эмбрионов из второго варианта опыта. Несмотря на это, изменчивость личинок из варианта с фотореактивацией по всем пяти исследованным признакам оказалась на 40-70% выше, чем из варианта с исключением фотореактивации (см. табл. 8). Таким образом, именно нефотореактивируемые повреждения ответственны за индуцированную изменчивость количественных признаков у карпа. По-видимому, такой вариант воздействия (дозы облучения 22 Дж/м² и выше + индукция фотореактивации) будет наиболее эффективным при получении мутагенизированного потомства карпа с целью его селекции по признакам продуктивности. Количество предмутационных повреждений при этом существенно возрастает, а выживаемость эмбрионов остается достаточно высокой, что позволяет избежать элиминации значительного числа потенциально мутантных особей.

ВЫВОДЫ

1. Облучение спермиев карпа коротковолновым УФ в дозах более 1 Дж/м² приводит к образованию в эмбриональных клетках аберраций хромосом и гибели эмбрионов и личинок. Полулетальная доза облучения для эмбрионального периода развития карпа составляет 6.0 Дж/м². При облучении спермиев в малых дозах (0.6 Дж/м²) обнаружен стимулирующий эффект, который проявляется в увеличении выживаемости эмбрионов.

2. В неоплодотворенных яйцеклетках и ранних зародышах карпа имеет место фотореактивация УФ-повреждений. В спермиях фотореактивация не протекает. Эффективный период фотореактивации УФ-повреждений спермиев в оплодотворенных яйцеклетках составляет 0.8 ть после осеменения. Снижение температуры инкубации приводит к удлинению пострадиационного дорепликативного периода и более полной фотореактивации УФ-повреждений спермиев.

3. Кофеин при воздействии до начала первой пострадиационной репликации ДНК усиливает летальный и цитогенетический эффекты облучения спермиев. Это указывает на существование у эмбрионов карпа кофеин-чувствительной системы репарации, которая действует или до, или во время репликации.

4. При осеменении УФ-облученных яйцеклеток УФ-облученными спермиями обнаружено взаимодействие эффектов облучения, которое выражается в усилении повреждения цитоплазматических структур яйцеклеток и ослаблении цитогенетического и летального эффектов

облучения спермиев. Это указывает, что исправление повреждений ДНК хромосом и повреждений цитоплазмы осуществляется одной и той же репаративной системой, причем репарации ДНК при этом отдается предпочтение.

5. Облучение неоплодотворенных яйцеклеток серебряного караса гиногенетической формы привело к возникновению мутаций генов гистосовместимости с частотой 6×10^{-3} . Причиной этих мутаций являются нефотореактивируемые повреждения ДНК хромосом яйцеклеток.

6. Изучены рыбоводно-биологические особенности УФ-мутагенизированных потомств карпа первого и второго поколений. Установлено, что летальное действие УФ ограничивается только эмбриональным и первыми этапами личиночного периода развития. Выживаемость эмбрионов второго поколения лишь незначительно ниже выживаемости интактных рыб. Среди мутагенизированных рыб первого поколения увеличено количество уродливых особей. По скорости роста и репродуктивной способности мутагенизированные карпы первого и второго поколений не уступают интактным.

7. УФ-облучение спермы приводит к увеличению изменчивости количественных признаков у личинок и сеголетков карпа в первом и втором поколениях. Повышенная изменчивость во втором поколении обусловлена более высокой по сравнению с контролем межсемейной вариацией признаков. Основной вклад в индуцированную изменчивость карпов второго поколения вносят нефотореактивируемые повреждения.

8. Сохранение повышенной изменчивости у мутагенизированных рыб второго поколения указывает на ее наследственный характер. Это открывает возможность использования индуцированного мутагенеза в селекции карпа и других рыб.

СПИСОК РАБОТ, ОБУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рекубратский А.В. Фотореактивация в неоплодотворенных яйцеклетках карпа // Тезисы Всесоюзной конференции молодых ученых "Методы интенсификации прудового рыбоводства / М:ВНИИПРХ, 1984. С. 127.
2. Рекубратский А.В. Фотореактивация УФ-повреждений спермиев карпа при различных условиях инкубации эмбрионов // Генетика. 1985. Т 21. N 5. С. 786-792.
3. Рекубратский А.В. Результаты исследований по УФ-мутагенезу у карпа // Тезисы III Всесоюзного совещания по генетике, селекции и гибридизации рыб / Москва, 1986. С. 186-188.

4. Рекубратский А.В. Методические указания по получению мутагенизированного потомства у карпа с применением УФ-излучения // М:ВНИИПРХ, 1988. 19 с.
5. Рекубратский А.В. Эффекты УФ-облучения спермиев карпа и их модификация кофеином // Генетика. 1989. Т. 25. N 11. С. 2033-2038
6. Рекубратский А.В. Результаты исследований Уф-индуцированного мутагенеза у карпа. I. Рыбоводно-биологическая характеристика мутагенизированных потомств первого и второго поколений // Сб. научн. трудов ВНИИПРХ. 1989. Вып. 58. С. 41-48
7. Рекубратский А.В. Влияние Уф-облучения спермиев карпа на изменчивость некоторых количественных признаков в мутагенизированном потомстве первого и второго поколений // Генетика. 1990. Т. 26. N 8. С. 1478-1483.
8. Рекубратский А.В. Ослабление эффекта Уф-облучения спермиев карпа в результате Уф-облучения неоплодотворенных яйцеклеток // Цитология. 1990. Т. 32. N 10. С. 1031-1036.
9. Recoubratsky A.V. Effects of UV-radiation following irradiation of gametes in common carp. //Abstr. 4-th Intern. Symp. on genetics in aquacult. Wuhan-China. 1991. P. 102.