



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66992** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A01K 67/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРОЦЕС ОТРИМАННЯ ОДНОСТАТЕВО-ЖІНОЧОГО ПОТОМСТВА У ОСЕТРОВИХ РИБ

1

(21) u201108776

(22) 12.07.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.

(72) МАРТИНЕНКО ДМИТРО ЛЕОНІДОВИЧ, МЕЛЬНИЧУК СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ, РИБАЛЬЧЕНКО ДМИТРО ЮРІЙОВИЧ, СПИРИДОНОВ ВЛАДИСЛАВ ГЕННАДІЙОВИЧ, ЧУМАК РОСТИСЛАВ МАКСИМОВИЧ, МАЛИШЕВА ОЛЬГА ОЛЕКСІЇВНА

(73) МАРТИНЕНКО ДМИТРО ЛЕОНІДОВИЧ, МЕЛЬНИЧУК СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ, РИБАЛЬЧЕНКО ДМИТРО ЮРІЙОВИЧ, СПИРИДОНОВ ВЛАДИС-

2

ЛАВ ГЕННАДІЙОВИЧ, ЧУМАК РОСТИСЛАВ МАКСИМОВИЧ, МАЛИШЕВА ОЛЬГА ОЛЕКСІЇВНА

(57) Процес отримання одностатево-жіночого потомства у осетрових риб, що включає індукцію гіногенетичного розвитку ембріонів шляхом запліднення яйцеклітин генетично інактивованою спермою, який **відрізняється** тим, що індукція гіногенетичного розвитку застосовується до яйцеклітин самок одного виду шляхом опромінення сперми ультрафіолетовими променями, а ініціацію гіногенезу здійснюють шляхом температурного шоку для заплідненої ікри.

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до геномної інженерії в області рибництва і, зокрема, спрямовано на вирішення проблеми регуляції статі у осетрових риб, продуцентів цінного харчового продукту - чорної ікри.

Відомі два підходи, за допомогою яких можна регулювати стать у риб: гормональна регуляція і генетична регуляція (Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987, 520 с.). Перший підхід полягає в зміні статевого складу в потомстві риб за допомогою впливу на них статевими гормонами. Другий підхід включає маніпуляції з геномами риб, у тому числі метод індукованого гіногенезу.

Відомий спосіб отримання одностатево-жіночого потомства у осетрових риб шляхом гормональної регуляції статі (Omoto H, Maebayashi M., Mitsuhashi E., Yoshitomi K., Adachi Sh., Yamauchi K. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F₂ hybrid sturgeon, the bester // Fisheries Sciences. 2002. Vol. 68. No 5. P. 1047-1054). Спосіб полягає в тому, що в певний період розвитку на риб впливають жіночими статевими гормонами - естрогенами. Такий вплив призводить до фемінізації самців, тобто розвитку у них замість сім'яників жіночих статевих залоз - яєчників. У відомому способі молоді бестера (гібриди між білугою, *Huso huso* і стерляддю, *Acipenser ruthenus*) згодовували корм, що містить жіночий статевий гормон естрадіол. У результаті було отримано потомство, яке

на 95 % складалося з самок. Недоліками способу є: неможливість отримання інверсії статі у всіх особин; пригнічення репродуктивної функції у генотипових самок і самців виникнення інтерсексів (гермафродитів) під впливом гормонів; крім того, впливу необхідно піддавати кожне нове покоління риб. У зв'язку з цим більш перспективним видається напрямок генетичної регуляції статі.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі, що заявляється є спосіб отримання одностатево-жіночого потомства американського веслоноса, *Polyodon spatula*, що відноситься до сімейства веслоноса, ряду Осетроподібні (Minis S. Aquaculture of paddlefish in the United States//Aquat. Living Resour. 2001. Vol 14. P. 391-398). Відомий спосіб включає в себе три етапи: індукцію гіногенетичного розвитку ембріонів шляхом запліднення яйцеклітин генетично інактивованою спермою, гормональну інверсію статі отриманих гіногенетичних самок і схрещування самців-інверсантів зі звичайними самками для отримання одностатево-жіночого потомства.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити процес отримання одностатево-жіночого потомства у осетрових риб шляхом застосування безпечних фізичних методів впливу на статеві продукти риб для отримання потомства осетрових риб виключно жіночої статі.

Поставлена задача вирішується тим, що процес отримання одностатево-жіночого потомства у осетрових риб здійснюється у виробничих умовах

(19) **UA** (11) **66992** (13) **U**

із застосуванням фізичних методів впливу на статеві продукти осетрових риб, а саме запропонований процес характеризується такими суттєвими ознаками - індукція гіногенетичного розвитку ембріонів шляхом запліднення яйцеклітин генетично інактивованою спермою, причому індукція гіногенетичного розвитку застосовується до яйцеклітин самок одного виду, шляхом опромінення сперми ультрафіолетовими променями, а ініціацію гіногенезу здійснюють шляхом температурного шоку для заплідненої ікри.

Запропонований процес здійснюється таким чином.

Відбір статевих продуктів від плідників осетрових риб здійснюють наступним чином: стимуляцію віддачі статевих продуктів у плідників здійснюють шляхом ін'єктування гормональними препаратами, сперму від самців відбирають за допомогою пластикових катетерів, ікру від самиць відбирають методом підрізання яйцеводів та наступного вільного зціджування. За 20 хвилин до імовірної віддачі самицями ікри у самців відбираються молоки (сперма) в окремі ємності для кожного. Відбирають по 1 мл сперми в окремі шприци, а іншу сперму, що залишилася, центрифугують при 6 тис. об/хв. протягом 20 хвилин. Отриману надосадову рідину в кількості 9 мл виливають на чашки Петрі разом зі спермою із шприца, вміщують на ротаційну платформу при 90 об/хв. і опромінюють ультрафіолетовою лампою протягом 2-4,5 хвилин. Відстань від лампи до опромінюваної сперми 27-28 см, спектр опромінення UVC, довжина хвилі 250 нм. Опромінену сперму розводять водою у співвідношенні 1:200 і негайно виливають до щойно відібраної ікри у кількості 100 г. Запліднення відбувається протягом 3-5 хвилин, після чого ікра знеклеюється протягом 10-12 хвилин. Знеклеєну ікру, що знаходиться у металевому ситі, вміщують до водяної бані при температурі 34 °C на 2 хвилини, після чого ікру вміщують в інкубаційні апарати для подальшої інкубації у звичайних умовах.

Контролюється відсоток запліднення ікри на стадії чотирьох бластомерів, а також на стадіях жовткової пробки та закладання нервової трубки. Після викльову передличинок їх переносять на відрощування до життєстійких стадій у басейни для досягнення маси 3-4 грами, потім молодь переводять на подальше вирощування у виробничих умовах.

Основним критерієм оцінки однорідності отриманого гіногенетичного потомства є відсутність у нього батьківських алелів. З цієї метою від плідників під час інкубації були відібрані зразки променів грудних плавців, а від отриманої молоді відбиралися зразки шляхом відтинання м'язової частини спини у найвищому її місці у 20-30 екземплярів. В лабораторних умовах виділяли ДНК, проводили полімеразну ланцюгову реакцію та проводили визначення нуклеотидної послідовності (сиквенс) за допомогою генетичного аналізатора «3130 Genetic Analyzer». Сиквенування ампліфіко-

ваних ділянок ДНК проводили за допомогою праймерів, що використовували для ПЛР.

Ідентифікацію розділених фрагментів проводили за допомогою програмного пакета "DNASequencingAnalysisSoftware, version 3.1" (Applied Biosystem, США).

Приклад здійснення процесу.

Для отримання гіногенетичного потомства було сформовано дві пари плідників стерляді. Під час настання нерестових температур (15-16 °C) була проведена гормональна стимуляція дозрівання статевих продуктів і їх відбір за виробничими стандартами. Сперму від кожного самця відбирали в окремі ємності. Для запліднення залишали по 1 мл сперми, яку зберігали на льоду до моменту запліднення. З метою отримання сімейної рідини сперму в кількості 10 мл окремо для кожного самця центрифугували при 6 тис. об/хв. протягом 20 хв. Отриману надосадову рідину в кількості 9 мл виливали на чашки Петрі шаром в 1 мм, додавали по 1 мл сперми, ставили на ротаційну платформу при 90 об/хв. і опромінювали ультрафіолетовою лампою протягом 2 та 4,5 хвилин з метою інактивації батьківської ДНК. Відстань від лампи до опромінюваної сперми була 28 см, довжина хвилі 250 нм., сила опромінення 1200 мВт/см². Опромінену сперму активували водою у співвідношенні 1:200. До відібраної ікри у кількості 100-110 г. додавали розведену сперму і проводили осіменіння протягом 3-5 хв. Запліднену ікру знеклеювали протягом 10-15 хвилин за виробничими стандартами. З метою ініціації гіногенезу ікру піддавали температурному шоку, для чого її у металевих ситах вміщували у водяну баню з температурою 34 °C на 2 хв. Після здійснення цієї процедури ікру переносили до апаратів Вейса, де відбувався подальший цикл інкубації. Проводився контроль за розвитком ікри на стадіях чотирьох бластомерів, стадії жовткової пробки та закладання нервової трубки.

Вживаність ікри за період інкубації знаходилася у межах норми, патологічних відхилень у розвитку ікри виявлено не було. Після викльову передличинок окремо за батьківськими парами було пересаджено на подальше відрощування до виробничих басейнів. Отримана молодь поводити себе так, як і притаманно рибам родини осетрових, у визначені терміни риби перейшли на активне живлення, пошукові реакції не порушені, аномалій розвитку не виявлено, відхід з вирощування знаходився у межах норми. Після відбору зразків ДНК та проведення ідентифікації фрагментів ДНК було встановлено, що у досліджуваних особин молоді стерляді батьківські алелі були відсутні. Дане дослідження вказує на успадковування молоддю материнського набору хромосом, що вказує на отримання гіногенетичного потомства.

Викладені вище відомості свідчать про те, що процес отримання одностатеві-жіночого потомства осетрових риб по заявленій корисній моделі належить до геномної інженерії в області рибництва і, зокрема, спрямований на вирішення проблеми регуляції статі у осетрових риб.

