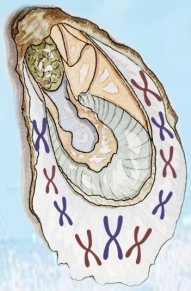
ИНДУКЦИЯ ГЕНЕРАТИВНОЙ ТРИПЛОИДИИ У ТИХООКЕАНСКИХ УСТРИЦ *CRASSOSTREA GIGAS* МЕТОДОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА



А.В. Синенко*, А.А. Анисимова, С.Е. Лескова, И.А. Дмитриева

*Институт Мирового океана, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, sinenko.avia@dvfu.ru**

Работа нацелена на отработку температурного метода получения жизнеспособного триплоидного спата тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* путем подбора оптимальных условий для температурного блока мейоза при искусственном оплодотворении яйцеклеток

В последние годы обозначился интерес к получению и выращиванию молоди *C. gigas* в России, в том числе в морских хозяйствах южного Приморья – в связи с увеличением спроса на товарную устрицу и необходимостью получения больших объемов посадочного материала.

Триплоидные устрицы как объект аквакультуры обладают рядом преимуществ:

- Ускоренный рост
- Сохранение высоких органолептических показателей в течение всего года
- Устойчивость к некоторым сезонным заболеваниям

← Ресурсы, используемые диплоидами для развития и функционирования половой системы, у триплоидов направляются на соматический рост.

Несмотря на то, что марикультура является одним из ведущих направлений хозяйственной деятельности на российском Дальнем Востоке, собственные технологии получения триплоидных моллюсков, как и опыт применения уже имеющихся наработок (США, Франция, Япония, Китай) отсутствуют. Назначение работы состоит в повышении темпов выращивания устриц до коммерческих размеров, улучшении товарного качества и вкусовых свойств конечного продукта в условиях приморских аквакультурных хозяйств.

Дизайн эксперимента по индукции триплоидии

- Протестированы безопасность и эффективность температурного метода индукции генеративной триплоидии у тихоокеанской устрицы *C. gigas* при разных вариантах тепловой обработки оплодотворенных яйцеклеток.
- В экспериментальном режиме были испытаны различные сочетания параметров: температура воздействия (32 и 36 °С), продолжительность воздействия (3, 5, 10 и 15 мин) и время начала воздействия (15, 20, 25, 30, 35, 40 и 45 мин после оплодотворения).
- При использованной температуре стимуляции нереста (21 °С) отделение второго полярного тельца в 50 % яиц было зафиксировано через 25 мин после оплодотворения (Рис. 1), поэтому выбранный нами интервал воздействия (15—45 мин после оплодотворения) должен перекрывать оба деления мейоза вплоть до начала митотических делений зиготы.

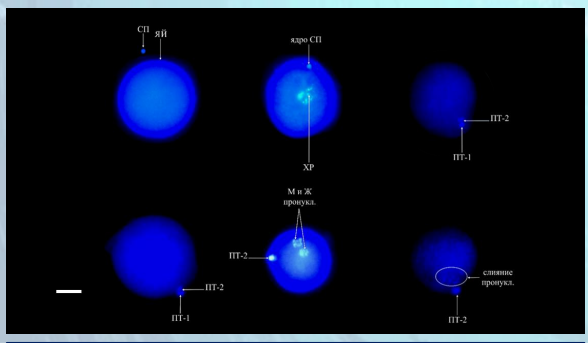


Рисунок 1 – Контроль оплодотворения и созревания яйцеклеток тихоокеанской устрицы *C. gigas* при температуре нереста 21 °С.
СП – сперматозоид, ЯЙ – яйцеклетка, ХР – хромосомы, ПТ-1 – первое полярное тельце, ПТ-2 – второе полярное тельце, М и Ж пронукл. – мужской и женский пронуклеусы.
Люминесцентная микроскопия; окраска DAPI; масштабный отрезок 20 мкм.

Оценка жизнеспособности личинок

- Безопасность разных вариантов воздействия была проверена путем мониторинга выживаемости, роста и развития личинок на всем протяжении их культивирования до стадии молоди (52 дня развития) (Рис. 2).
- В ходе культивирования были выявлены критические стадии развития, когда выживаемость личинок драматически снижалась.
- В разных группах, обработанных температурой 32 °С, выживаемость на одних и тех же стадиях варьировала от 1 до 99 %.
- Независимо от условий эксперимента, наилучшую выживаемость демонстрировали эмбрионы на стадии трохофоры и осевшая молодь при достижении возраста 42 и 52 дней.
- Критическими для всех групп оказались стадии велигера и великонх, на которых наблюдали массовую гибель личинок с последующей стабилизацией численности особей после осаждения на субстрат.
- Использование температуры 36 °С во всех вариантах привело к гибели личинок на стадии велигера.

Эффективность разных вариантов воздействия в отношении индукции триплоидии была проверена на разных стадиях: велигер (2 дня развития), великонх (10 дней развития) и педивелигер (26 дней развития)

- Для скрининга использовали групповой подход, основанный на совместной дезагрегации личинок одной группы до состояния клеточной суспензии с оценкой содержания ДНК в ядрах, высвобождающихся в коллективный образец, методом **проточной цитометрии** (Рис. 3).

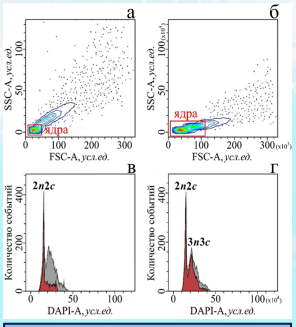


Рисунок 3 – Анализ групповых дезагрегатов двухдневных личинок тихоокеанской устрицы *C. gigas* методом проточной цитометрии на предмет дифференциации ядер разной плоидности (*n*).
а – диплоидные ядра на гистограммах распределения синглетов по сигналам светорассеяния;
б – ядра разной плоидности на гистограммах распределения синглетов по сигналам светорассеяния;
в – идентификация диплоидных (*2n2c*) ядер (выделены красным) на гистограммах распределения синглетов по интенсивности сигнала DAPI;
г – идентификация диплоидных (*2n2c*) и триплоидных (*3n3c*) ядер (выделены красным) на гистограммах распределения синглетов по интенсивности сигнала DAPI.

- Для оценки вклада отдельных особей в коллективную ядерную суспензию дополнительно производили индивидуальную оценку плоидности личинок методом компьютерного анализа Z-стеков, полученных с помощью **конфокального микроскопа** (Рис. 4).

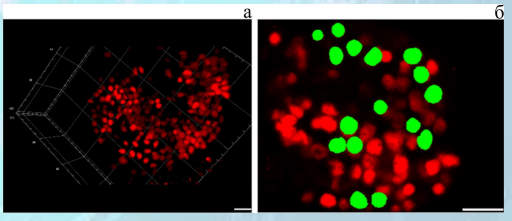


Рисунок 4 – Компьютерный анализ конфокальных изображений двухдневных личинок тихоокеанской устрицы *C. gigas*.
а – многосекционное полнообъемное изображение (Z-стек) личинки; б – оценка содержания ДНК в отельных ядрах личинки.
красный цвет – клеточные ядра, окрашенные йодистым пропидием;
зеленый цвет – выделение областей, соответствующих ядрам, для измерения содержания ДНК. Масштабный отрезок 10 мкм.

Сопоставление результатов, полученных двумя методами, показало, что проточная цитометрия имеет ограничения в определении количества триплоидов в исследуемом образце

- Анализ групповых дезагрегатов (коллективных ядерных суспензий) выявил две волны триплоидизации ядер: при воздействии через 25–30 и через 45 мин после оплодотворения (около 35 % триплоидных ядер в групповых образцах).
- Микроскопический анализ отдельных личинок показал, что тепловая обработка через 45 мин (завершение мейоза – начало дробления) приводит к образованию большого количества гетероплоидных мозаик с дефицитом клеток, содержащих ядра 2, 3, 4 и 5 *c* (Рис. 5, №1).
- В условиях групповой дезагрегации, гетероплоидные особи искусственно завышали процент триплоидов, выявляемых методом проточной цитометрии. По данным индивидуального анализа, реальный процент триплоидных личинок не превышал 20 % при обработке через 45 мин после оплодотворения.
- Личинки из этой группы погибли на стадии велигера (3-й день развития), в отличие от многих групп, обработанных на более ранних сроках.

Интерес представляют группы, полученные в результате теплового воздействия через 25-30 мин после оплодотворения, что соответствует времени отделения второго полярного тельца

- Индивидуальный анализ личинок показал, что реальное количество триплоидных особей в таких группах даже выше, чем регистрирует проточная цитометрия в групповых дезагрегатах, и составляет около 50 %. При этом гетероплоидные мозаики регистрировались гораздо реже и не имели дефицита клеток (Рис. 5, №2).
- Высокой уровень содержания триплоидов в этой группе сохранялся и на 10-й день развития (великонх), составляя 48 %.
- При дальнейшем культивировании из этих личинок был получен жизнеспособный спат.

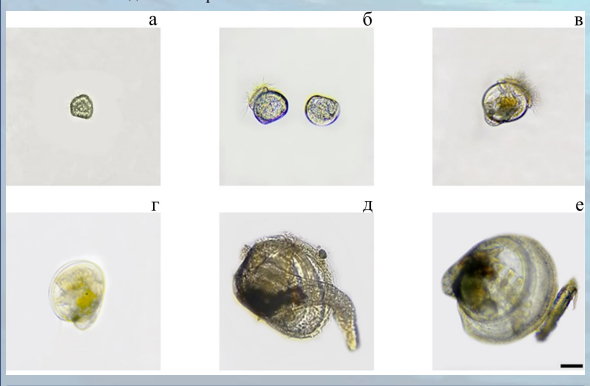


Рисунок 2 – Личиночное развитие тихоокеанской устрицы *C. gigas*.
а – трохофора; б – велигер; в – великонх; г – педивелигер с глазком;
д – педивелигер; е – осевшая молодь.
Масштабный отрезок 50 мкм.

Работа выполнена в рамках темы НИОКР № 24-05-1.06-0006.

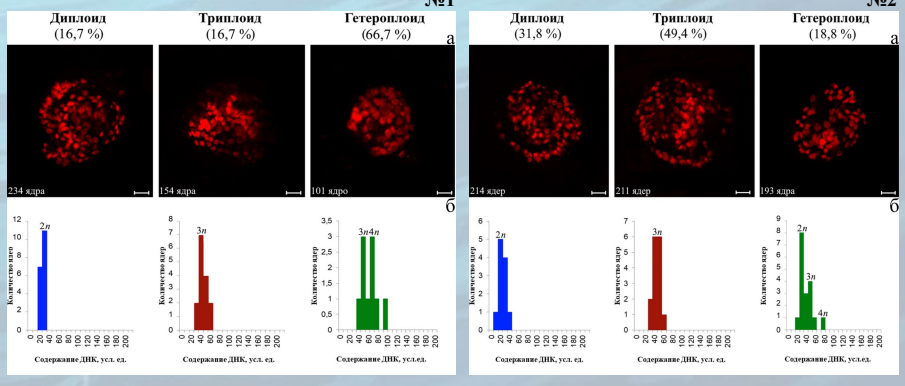


Рисунок 5 – Структурная и генетическая характеристика двухдневных личинок, полученных при 15-минутном воздействии температуры 32 °С спустя 45 мин после оплодотворения (№1) и при 5-минутном воздействии через 25 мин после оплодотворения (№2).
а – отдельный оптический срез личинки с визуализацией клеточных ядер (ядра посчитаны по всему объему мультисекционного изображения); б – определение класса плоидности отдельно взятой личинки (*n*) на основании измерения содержания ДНК в ее ядрах. Масштабный отрезок 10 мкм.