УДК 577.213/.215: 639.3
DOI: 10.15587/2313-8416.2015.56684

ІНДУКОВАНИЙ ГІНОГЕНЕЗ ОСЕТРОВИХ РИБ З ЕКСПЕРТИЗОЮ ПОХОДЖЕННЯ ПОТОМСТВА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ДНК-МАРКЕРАМИ

© О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов, Х. М. Курта

Розглянуто підхід щодо застосування методу індукції гіногенезу осетрових риб на основі фізичних методів впливу на статеві продукти. В результаті проведених робіт було визначено оптимальні параметри опромінення сперми бестера ультрафіолетовими променями та індукції гіногенезу стерляді тепловим шоком. Походження отриманого гіногенетичного потомства підтверджено експертизою мікросателітних ДНК-маркерів
Ключові слова: *індукований гіногенез, стерлядь, бестер, мікросателітні ДНК-маркери, локус, алель, генотип*

The approach for the application of the gynogenesis induction method of sturgeon based on physical methods to influence the sexual products was considered. As a result of this work, the optimal exposure settings of the bester sperm by ultraviolet rays and gynogenesis induction of the sterlet by the thermal shock were defined. The origin of the obtained gynogenetic offspring was proved by the expertise of microsatellite DNA markers
Keywords*: induced gynogenesis, sterlet, bester, microsatellite DNA markers locus, allele, genotype*

1. Вступ

В сучасних умовах підвищеної потреби населення планети у продуктах харчування, особливої уваги заслуговує питання нарощування обсягів виробництва продукції тваринного походження, і продукція аквакультури в цьому плані не є виключенням [1, 2]. Осетрові риби є цінними об'єктами як вітчизняної, так і світової аквакультури, тому виникає особливий інтерес в їх відтворенні та товарному вирощуванні. Слід зазначити, що ці об'єкти є зникаючими та занесеними до Червоної книги, промисел на них заборонений. Крім того майже всі представники родини осетрових внесені до списку конвенції CITES [3, 4].

В умовах різкого скорочення природних популяцій осетрових риб сучасне осетрівництво орієнтоване в основному на отримання ікри і потомства з метою їх комерційної реалізації [5, 6]. Пізнє дозрівання осетрових риб (7–15 років) і неможливість визначити стать аж до віку статевого дозрівання тягне за собою низку непродуктивних витрат вирощувальних площ, кормів, енергії та праці, оскільки самці становлять близько 50 % стада. Тому, отримання одностатево-жіночого (гіногенного) потомства у осетрових видів риб викликає підвищений інтерес, оскільки дозволяє вирішити проблему масового виробництва делікатесу – чорної харчової ікри та скоротити витрати на вирощування надлишкових самців [7, 8].

У вирішенні питань забезпечення ефективності штучного відтворення риб, все більшого розповсюдження набуває використання сучасних методів молекулярно-генетичних досліджень із застосуванням мікросателітних ДНК-маркерів, за допомогою яких можна оцінити внутрішньовидовий генетичний поліморфізм популяцій, підтвердити достовірність походження отриманого потомства, здійснити видову та індивідуальну ідентифікацію кожної окремої особини [9, 10].

Дослідження подібного плану є актуальними для подальших успішних робіт з підвищення ефективності розведення та відтворення цінних видів риб, що матиме перспективу для рибоводних господарств України в умовах сучасного ведення аквакультури.

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

В основу досліджень з гіногенезу поставлене завдання удосконалити процес отримання потомства від осетрових видів риб виключно жіночої статі [8, 10]. Регуляцію статі у осетрових використовують для вирішення важливих селекційних та господарських задач. За інтенсивної форми ведення рибництва доволі часто виникає необхідність вирощувати особин лише однієї статі. Так, при розведенні лососевих, осетрових та коропових вирощування самиць є більш вигідним, через їх кращі темпи росту та пізніші строки настання статевої зрілості. До того ж самиці лососевих та осетрових риб є продуцентами не лише делікатесного м'яса, а й такого цінного продукту, як червона та чорна ікра [12, 13].

За останні роки роботи зі штучного відтворення осетрових видів риб активно проводяться як для вирощування в умовах товарної аквакультури, так і для відновлення природних популяцій. Наукові дослідження з удосконалення технології штучного відтворення осетрових видів риб і розроблення методів управління статтю сприяють вирішенню проблеми виробництва дороговартісної продукції аквакультури [14].

Індукований гіногенез здійснюють шляхом осіменіння зрілої ікри інактивованою спермою. Як фактори інактивації ДНК самців при отриманні гіногенетичних нащадків використовують високі дози радіаційного або ультрафіолетового опромінення сперми. Осіменіння ікри генетично інактивованою спермою призводить до утворення гаплоїдних зародків, що розвиваються під контролем одинарного жіночого набору хромосом. Гіногенетичні зародки мають гаплоїдний набір хромосом – редуковану в процесі мейозу кількість аутосом і одну Х-хромосому. Гаплоїди у риб не можуть нормально розвиватися і гинуть в ході ембріогенезу або незабаром після вилу-

плення предличинок. Диплоїдизацію гіногенетичних гаплоїдів проводять за допомогою пригнічення другого поділу мейозу, піддаючи ранніх зародків температурному шоку, який викликає об'єднання гаплоїдних хромосомних наборів яйцеклітини і другого полярного тільця. При цьому відновлюється диплоїдний набір аутосом і статевих хромосом [15, 16].

Дослідження подібного плану досить успішно проводяться закордонними науковцями. Наприклад, в таких країнах як США, Канада, Росія, Польща, Іран, Китай, тощо, вже здійснено дослідження з такими видами осетрових риб, як: російський осетер, сибірський осетер, білий та тупорилий осетри, севрюга, шип, стерлядь та гібрид білуги зі стерляддю – бестер [14–21].

Загальними ознаками теперішніх методів отримання одностатево – жіночого потомства є гормональна стимуляція дозрівання та відбір статевих продуктів від плідників осетрових риб за виробничими стандартами, проведення індукції гіногенезу шляхом ультрафіолетового опромінення сперми та температурної обробки запліднені ікри, отримання гіногенетичного потомства, візуалізація та аналіз результатів, який дозволяє виявити спадковість генетичного матеріалу потомства за материнською лінією [13–19].

Метою дослідження було проведення оптимізації методів отримання гіногенетичного потомства осетрових риб під контролем ДНК-маркерів.

3. Матеріали та методи досліджень

3. 1. Досліджувані матеріали та обладнання, що використовувалися в експерименті

Спеціальні дослідження проводилися на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Матеріалом для дослідження були самиці стерляді та самці бестера, отримані умовах штучного розведення.

В якості фізичних методів впливу для інактивації батьківської ДНК сперми осетрових було обрано короткохвильове ультрафіолетове опромінення. Для запліднені ікри використовували тепловий шок, з метою ініціації повернення другого полярного тільця у ядро і подвоєння власного генетичного набору яйцеклітини.

Стимуляцію віддачі статевих продуктів у плідників здійснювали шляхом ін'єктування гормональними препаратами за виробничими стандартами [22–24].

Статеві продукти від самців (не менше 10 $см^3$) отримували шляхом відбору в сухі стерильні катетери окремо для кожного самця. Оцінювання якості сперми за кольором, густиною, кількістю, концентрацією та рухливістю сперміїв проводили візуально та під світловим мікроскопом [22]. По 1 $см^3$ відібраної сперми вміщували в стерильні промарковані пробірки типу Eppendorf і центрифугували при 8000 об/хв. на протязі 15 хв. Отриману надосадову рідину у кількості 4 $см^3$ змішували з 1 $см^3$ не центрифугованої сперми та виливали на чашки Петрі шаром в 1 мм. Чашки Петрі (ø 100 мм) з розведеною спермою вміщували на ротаційну платформу при 90 об/хв. і опромінювали ультрафіолетовою лампою ОБП-15 при довжині хвилі 254 нм. Ікру від самиць відбирали шляхом підрізання яйцеводів та наступного вільного зціджування [23]. Опромінену сперму активували водою у співвідношенні 1:200 і запліднювали ікру протягом 2 хвилин з розрахунку 1 $см^3$ розведеної сперми на 100 г ікри. Осіменіння ікри здійснювали напівсухим способом, після чого ікру знеклеювали протягом 2–3 хвилин суспензією таніну. Знеклеєну ікру вміщували в металеві сита і піддавали дії температурного шоку при температурі 34 °С протягом 2 хвилин в умовах водяної бані. Після температурного шоку ікру переносили в інкубаційні апарати Вейса для подальшої інкубації у звичайних умовах. Відсоток запліднення та розвиток ікри контролювали на стадії чотирьох бластомерів, а також на стадіях гаструляції та закладання нервової трубки. Після викльову, передличинок переносили на підрощування до життєстійких стадій у дослідні басейни окремо за варіантами досліду. При досягненні маси 3 г. молодь переводили на подальше вирощування у виробничих умовах [22, 24].

Для проведення спеціальних молекулярно-генетичних досліджень від плідників та отриманого потомства були прижиттєво відібрані зразки біоптату грудних плавців. Для робіт з генотипування було використано три пари мікросателітних ДНК-маркерів: LS-19, LS-68 та LS-39, які ефективно використовуються для таксономії та генетичної ідентифікації осетрових риб і занесені до міжнародної генетичної бази даних GenBank [25]

3. 2. Методика визначення показників властивостей зразків

Виділення ДНК проводили з використанням набору "ДНК-сорб-В" («Амплі-Сенс», Росія), згідно з інструкцією виробника [26]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили згідно умов, оптимізованих на базі відділу молекулярно-генетичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК [27, 28]. Продукти ампліфікації денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли шляхом капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі "ABI Prism 3130" Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Розміри алелів визначали за допомогою програми "Gene Mapper 3.7" (Applied Biosystems, США) з використанням стандарту S-450 (Синтол, Росія).

Визначення спектру частот алелів проводили шляхом підрахунку та аналізу отриманих генотипів досліджуваних особин із застосуванням програми Power Stats V12 (Promega) [29, 30].

4. Результати досліджень

Для проведення робіт з отримання одностатево-жіночого потомства стерляді було сформовано три варіанти досліду з дозою ультрафіолето0 вого опромінення для сперми бестера: 1 варіант – 100 $Дж/м^2$; 2 варіант – 200 $Дж/м^2$; 3 варіант – 300 $Дж/м^2$ та тепловим шоком ікри при температурі 34 ºС (табл. 1).

Крім того, було заплановано три контрольних варіанти досліду:

– гаплоїдний контроль (ікра запліднена опроміненою спермою у дозі 300 Дж/м^2 без обробки тепловим шоком) для перевірки інактивації батьківської ДНК та відсутності ініціації яйцеклітини до подвоєння власного генетичного матеріалу за відсутності теплового шоку;

– тепловий контроль (ікра запліднена нормальною спермою та оброблена тепловим шоком) для перевірки безпечності впливу підвищеної температури на процес запліднення;

– виробничий контроль (ікра запліднена нормальною спермою без обробки тепловим шоком) для перевірки якості статевих продуктів та відповідності виконання стандартних технологічних операцій зі штучного відтворення.

В результаті проведення досліджень з індукції гіногенезу осетрових риб було отримано потомство стерляді з трьох дослідних варіантів. Найбільший вихід молоді з вирощування був у першому дослідному варіанті (38 %), а найменший – у третьому варіанті (24 %). У гаплоїдному контролі майже вся ікра загинула і вихід вільних ембріонів з інкубації був меншим за 1 %. Це свідчить про те, що під дією ультрафіолетового опромінення відбулася генетична інактивація сперматозоїдів, проте без впливу теплового шоку подвоєння генетичного набору яйцеклітин не відбулося, внаслідок чого зародки з гаплоїдним набором хромосом виявилися нежиттєздатними (табл. 2).

У тепловомку контролі, де ікру, запліднену звичайною спермою, піддавали тепловому шоку, вихід молоді був на рівні 44 %, що свідчило про нормальний перебіг розвитку ембріонів та відсутність шкідливого впливу короткотривалої дії підвищеної температури на процес запліднення та ембріогенезу.

Якість статевих продуктів виявилася достатньо високою, оскільки у виробничому контролі вихід молоді з вирощування сягав виробничих нормативів – близько 58,0 %.

Таблиця 1

Схема досліду з індукції гіногенезу

Варіанти досліду	1	2	3	Гаплоїдний контроль	Тепловий контроль	Виробничий контроль
Доза УФ-опромінення сперми, Дж/м^2	100	200	300	300	0	0
Тепловий шок для заплідненої ікри, ºС	34	34	34	–	34	–

Таблиця 2

Вихід живих особин у результаті проведення досліджень з індукції гіногенезу

Варіанти досліду	Кількість запліднених ікринок, шт	Стадії розвитку							
		Гаструла		Нейрула		Вільні ембріони		Молодь у віці 45 діб	
		шт	%	шт	%	шт	%	шт	%
Варіант 1 (100 Дж/м^2)	958	517	46	248	34	116	28	53	38
Варіант 2 (200 Дж/м^2)	893	428	38	219	28	78	24	25	32
Варіант 3 (300 Дж/м^2)	967	328	27	210	19	27	12	3	24
Гаплоїдний контроль	782	86	11	45	6	0	0	0	0
Тепловий контроль	684	424	62	624	57	115	48	50	44
Виробничий контроль	875	682	78	651	75	347	68	201	58

*Примітка: * – виробничий норматив виходу молоді з вирощування – 60 %*

Основним критерієм оцінки однорідності отриманого гіногенетичного потомства є відсутність у нього батьківських алелів. З цією метою від отриманої молоді у віці 45 діб відбиралися фрагменти плавців та проводився аналіз ядерної ДНК за трьома мікросателітними локусами LS-19, LS-68 та LS-39, за якими були визначені відмінності в алельних варіантах між батьківськими особинами та отриманим потомством (табл. 3).

Результати мікросателітного аналізу показали, що молодь теплового варіанту мала триплоїдний набір алелів за всіма досліджуваними мікросателітними локусами, де були виявлені два материнські та один батьківський алель. Таке явище свідчить не лише про безпечність короткотривалого впливу підвищеної температури на нормальний процес запліднення, але й про наявність ініціації теплового шоку до подвоєння власного генетичного набору яйцеклітини за рахунок повернення другого полярного тільця назад у ядро, що і призвело до триплоїдності отриманого потомства.

Молодь з варіанту виробничого контролю, отримана від звичайного схрещування самиці стерляді та самця бестера, мали по одному материнському та батьківському алелю кожного локусу. Це свідчить про те, що відбулося звичайне запліднення, яке підтверджує здатність статевих продуктів до участі у природному процесі відтворення.

У особин, отриманих в результаті схрещування з використанням опроміненої сперми у першому варіанті були виявлені материнські алелі лише за локусом LS-19, а за локусами LS-68 та LS-39 було виявлено часткове успадкування материнських алелів у отриманого потомства, що вказує на неповний гіногенез в результаті недостатньої дози опромінення і, як наслідок, неповної інактивації батьківської ДНК.

У другому та третьому варіантах досліду за мікросателітними локусами були виявлені лише материнські алелі, що вказує на інактивацію батьківської ДНК під дією ультрафіолетового опромінення та ініціації яйцеклітин до подвоєння власного генетичного набору під дією теплового шоку. Отримані дані дослідних варіантів № 2 та № 3 свідчать про повну генетичну інактивацію сперміїв в результаті ультрафіолетового опромінення та ініціації яйцеклітин до подвоєння власного генетичного набору шляхом теплового шоку та отримання життєздатного гіногенетичного потомства.

З огляду на досить низькі показники виходу отриманої молоді з вирощування у третьому варіанті досліду, проти вищих показників виходу у другому варіанті, нами було визначено, що другий варіант досліду з дозою опромінення 200 Дж/м^2 слід вважати найбільш оптимальним для застосування при індукції гіногенезу між самками стерляді та самцями бестера.

Таким чином, на прикладі стерляді та бестера, було здійснено індукцію мейотичного гіногенезу і отримано життєздатне одностатево жіноче потомство осетрових риб. Результати даного дослідження підтверджують принципову можливість використання даного підходу для створення маточного селекційно-племінного ядра плідників, яке буде складатися лише з самиць для отримання від них харчової чорної ікри. Крім того буде досягнута умова збереження та відтворення генофондів цінних зникаючих видів риб не тільки з чоловічим, але і з жіночим типом гетерогаметності. З огляду на пластичність осетрових до міжвидової гібридизації, у роботах з індукції гіногенезу може бути використана сперма будь-якого доступного виду осетрових риб.

Таблиця 3

Результати мікросателітного аналізу батьківських особин та отриманого потомства

Особини	Мікросателітні ДНК-маркери		
	LS-19	LS-68	LS-39
Батьківська пара	Самиця стерляді		
	EG	WZ	ML
	Самець бестера		
	MM	RT	FT
Варіант 1			
Потомство	EE	RW	ML
	EE	WZ	FM
	EE	TW	MM
	EE	TZ	MT
	EE	ZZ	LL
	Варіант 2		
	EG	WW	MM
	EG	WW	ML
	EE	WZ	ML
	EG	ZZ	MM
	GG	WZ	LL
	Варіант 3		
	EE	WZ	ML
	EE	WZ	LL
	EG	ZZ	LL
	EG	ZZ	ML
	GG	WW	ML
	Тепловий контроль		
	EGM	WZR	MLT
	EGM	WZR	MLF
	EGM	WZT	MLT
	EGM	WZT	MLF
	EGM	WZR	MLF
	Виробничий контроль		
	EM	RW	FM
	GM	TZ	MT
	GM	TW	FL
	EM	RZ	MT
	EM	TZ	LT

5. Висновки

У результаті проведених досліджень було проведено індукцію гіногенезу та отримано одностатево-жіноче потомство стерляді. На основі отриманих результатів було визначено оптимальні параметри індукції гіногенезу стерляді короткотривалим тепловим шоком при температурі води для запліднених ікри 34 ºС, що підтверджено експертизою походження отриманих гіногенетичних особин з виключно материнськими алелями мікросателітних локусів ДНК. Встановлено оптимальну дозу ультрафіолетового опромінення для сперми бестера у 200 Дж/м^2. За результатами штучного відтворення вихід із вирощування для гіногенетичних особин був на рівні 32 %.

Результати даного дослідження підтверджують принципову можливість використання даного підходу для створення маточного селекційно-племінного ядра плідників, яке буде складатися лише з самок для отримання від них харчової чорної ікри – продукту високої вартості і підвищення ефективності роботи рибоводних відтворювальних комплексів. Крім того, буде досягнута умова збереження цінних та зникаючих об'єктів аквакультури за рахунок їх більш раціонального використання в умовах штучного відтворення та вирощування на сучасному етапі підвищеного антропогенного впливу на природні екосистеми.

Література

1. Birstein, V. J. The threatened status of acipenseriform species: a summary [Text] / V. J. Birstein, W. E. Bemis, J. Waldman // Developments in Environmental Biology of Fishes. – 2002. – P. 427–435. doi: 10.1007/0-306-46854-9_33

2. Третяк, О. М. Стан запасів осетрових риб та розвиток осетрової аквакультури в Україні [Текст] / О. М. Третяк, Б. О. Ганкевич, О. М. Колос, Т. В. Яковлєва // Рибогосподарська наука України. – 2010. – № 4. – С. 4–22.

3. Raymakers, C. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes [Text] / C. Raymakers // Journal of Applied Ichthyology. – 2006. – Vol. 22, Issue s1. – P. 53–65. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00929.x

4. Raymakers, C. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries [Text] / C. Raymakers, C. Hoover // Journal of Applied Ichthyology. – 2002. – Vol. 18, Issue 4-6. – P. 629–638. doi: 10.1046/j.1439-0426.2002.00398.x

5. Баранникова, И. А. Проблема сохранения осетровых в современный период [Текст]: тез. докладов междунар. конф. / И. А. Баранникова, С. И. Никоноров, А. Н. Белоусов. – Осетровые на рубеже XXI века. – Астрахань, 2000. – С. 7–9.

6. Виноградов, В. К. Коллекционные хозяйства как основа организации племенного дела в аквакультуре [Текст]: тез. докл. / В. К. Виноградов, Е. А. Мельченное, О. Б. Харзин. – «Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре». – Краснодар, 1996. – С. 40.

7. Рекубратский, А. В. Мейотический гиногенез у севрюги, русского осетра и стерляди [Текст] / А. В. Рекубратский, В Л. Грунина, В. А. Барминцев, Т. С. Голованова, О. С. Чудинов, А. В. Абрамова, Н. С. Панченко, С. Л. Купченко // Онтогенез. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 92–102.

8. Omoto, H. Effects of estradiol-17 and 17 - methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrids turgeon, the bester [Text] / N. Omoto, M. Maebayashi, E. Mitsuhashi, K. Yoshitomi, S. Adachi, K. Yamauchi //

Fisheries Science. – 2002. – Vol. 68, Issue 5. – P. 1047–1054. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00531.x

9. Козлова, Н. В. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб [Текст] / Н. В. Козлова, Н. Н. Базелюк, Д. Р. Файзулина, Е. В. Стоногина // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хазяйство. – 2013. – № 3. – С. 113–117.

10. Гречко, В. В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематике [Текст] / В. В. Гречко // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 8. – С. 1013–1033.

11. Grunina, A. S. Viable nucleoplasms hybrids produsedby dispermic androgenesis: experiments on sturgeons [Text] / A. S. Grunina, A.V. Recoubratsky, V. A. Barmintsev, O. S. Chudinov, A. B. Abramova, M. S. Chebanov. – USA, 2001.

12. Грунина, А. С. Жизнеспособное гиногенетическое потомство сибирского осетра, полученное с использованием яйцеклеток, овулировавших in vitro [Текст] / А. С. Грунина, М. Н. Скоблина, Б. Ф. Гончаров и др. // Российская академия наук. Издательство “Наука”. – 2010. – Т. 431, № 2. – С. 269–273.

13. Recoubratsky, A. V. RAPD-PCR evidence of dispermic origin of diploid androgenetic sturgeons [Text] / A. V. Recoubratsky, , A. S. Grunina, V. A. Barmintsev, O. S. Chudinov, A. B. – USA, 2001.

14. Van Eenennaam, A. L. Evidence of female hetero – gametic genetic sex determination in white sturgeon [Text] / A. L. Van Eenennaam // Journal of Heredity. – 1999. – Vol. 90, Issue 1. – P. 231–233. doi: 10.1093/jhered/90.1.231

15. Flynn, S. R. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, Acipenser brevirostrum Lesuere [Text] / S. R. Flynn, M. Matsuoka, M. Reith, D. J. Martin-Robichaud, T. J. Benfey // Aquaculture. – 2006. – Vol. 253, Issue 1-4. – P. 721–727. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.09.016

16. Fopp-Bayat, D. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (Acipenser ruthenus) using UV-irradiated bester sperm [Text] / D. Fopp-Bayat, R. Kolman, P. Woznicki // Aquaculture. – 2007. – Vol. 264, Issue 1-4. – P. 54–58. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.006

17. Fopp-Bayat, D. Verification of meiotic gynogenesis in Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt) using microsatellite DNA and cytogenetical markers [Text] / D. Fopp-Bayat // Journal of Fish Biology. – 2007. – Vol. 71, Issue sc. – P. 478–485. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01704.x

18. Fopp-Bayat, D. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt) [Text] / D. Fopp-Bayat // Aquaculture. – 2010. – Vol. 305, Issue 1-4. – P. 174–177. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.04.011

19. Mims, S. D. A method for irradiation of shovelnose sturgeon, Scaphirhynchus platorynchus, milt to induce gynogenesis for paddlefish, Polyodon spathula [Text] / S. D. Mims, W. L. Shelton // Proceedings of the Fourth Asian Fishery Forum. Beijing, 1995. – P. 395–397.

20. Moan, J. Effects of UV radiation on cells [Text] / J. Moan, M. J. Peak // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1989. – Vol. 4, Issue 1. – P. 21–34. doi: 10.1016/1011-1344(89)80099-5

21. Saber, M. H. Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (Acipenser stellatus Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers [Text] / M. H. Saber, S. B. Noveiri, M. Pourkazemi, M. Yarmohammadi // Aquaculture Research. – 2008. – Vol. 39, Issue 14. – P. 1483–1487. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02015.x

22. Чебанов, М. С. Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб [Текст] / М. С. Чебанов, Е. В. Галич // Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН. – Анкара, 2013. – 328 с.

23. Подушка, С.Б. Прижизненное получение икры у осетровых рыб [Текст]: тез. докл. всерос. конф. / С. Б. Подушка // Биологические ресурсы и проблемы развития аквакультуры на водоемах Урала и Западной Сибири. – Тюмень, 1996. – С. 115–116.

24. Васильева, Л. М. Технология и нормативы по товарному осетроводству в IV рыбоводной зоне [Текст] / Л. М. Васильева, А. П. Яковлева, Т. Г. Щербатова и др.; под ред. Н. В.Судаковой. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 100 с.

25. May, B. Genetic variability at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in Acipenser and Scaphirinchus [Text] / B. May, C.C. Krueger, H.L. Kincaid // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 1997. – Vol. 54, Issue 7. – P. 1542–1547. doi: 10.1139/cjfas-54-7-1542

26. Boom, R. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids [Text] / R. Boom, C. Sol, M. Salimans et. al. //Journal of clinical microbiology. – 1990. – Vol. 28. – P. 495–503.

27. Димань, Т. М. Полімеразна ланцюгова реакція : методичні рекомендації [Текст] / Т. М. Димань, В. І. Глазко. – Біла Церква, 2004. – 62 с.

28. Рєзникова-Галашевич, І. С. Генетична ідентифікація промислових видів риб: методичні рекомендації [Текст] / І. С. Рєзникова-Галашевич, В. В. Степура, А. В. Шельов та ін. – К.: Видавничий ц ентр НУБіП України, 2011. – 35 с.

29. Kalinowski, S. T. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [Text] / S. T. Kalinowski, M. L. Taper, T. C. Marshall // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 16, Issue 5. – P. 1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x

30. Marshall, T. C. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [Text] / T. C. Marshall, J. Slate, L. E. B. Kruuk, J. M. Pemberton // Molecular Ecology. – 1998. – Vo. 7, Issue 5. – P. 639–655. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374

References

1. Birstein, V. J., Bemis, W. E., Waldman, J. R. (2002). The threatened status of acipenseriform species: A summary. Developments in Environmental Biology of Fishes, 427–435. doi: 10.1007/0-306-46854-9_33

2. Tretjak, O. M., Gankevych, B. O., Kolos, O. M., Jakovljeva, T. V. (2010). Stan zapasiv osetrovyh ryb ta rozvytok osetrovoi' akvakul'tury v Ukrai'ni // Rybogospodars'ka nauka Ukrai'ny, 4, 4–22.

3. Raymakers, C. (2006). CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of Acipenseriformes. Journal of Applied Ichthyology, 22 (s1), 53–65. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00929.x

4. Raymakers, C., Hoover, C. (2002). Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries. Journal of Applied Ichthyology, 18 (4-6), 629–638. doi: 10.1046/j.1439-0426.2002.00398.x

5. Barannikova, I. A., Nikonorov, S. I., Belousov, A. N. (2000). Problema sohranenija osetrovyh v sovremennyj period. Osetrovye na rubezhe HHI veka. Astrahan', 7–9.

6. Vinogradov, V. K, Mel'chennoe, E. A., Harzin, O. B. (1996). Kollekcionnye hozjajstva kak osnova organizacii plemennogo dela v akvakul'ture. Resursosberegajushhie tehnologii v akvakul'ture». Krasnodar, 40.

7. Rekubratskij, A. V., Grunina, V. L., Barmincev, V. A., Golovanova, T. S., Chudinov, O. S., Abramova, A. V., Panchenko, N. S., Kupchenko, S. L. (2003). Mejoticheskij ginogenez u sevrjugi, russkogo osetra i sterljadi. Ontogenez, 34 (2), 92–102.

8. Omoto, N., Maebayashi, M., Mitsuhashi, E., Yoshitomi, K., Adachi, S., Yamauchi, K. (2002). Effects of estradiol-17beta and 17alpha-methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. Fisheries Science, 68 (5), 1047–1054. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00531.x

9. Kozlova, N. V., Bazeljuk, N. N., Fajzulina, D. R, Stonogina, E. V. (2013). Primenenie molekuljarno-geneticheskih issledovanij v akvakul'ture osetrovyh ryb. Vestnik AGTU. Serija: Rybnoe hazjajstvo, 3, 113–117.

10. Grechko, V. V. (2002). Molekuljarnye markery DNK v izuchenii filogenii i sistematike. Genetika, 38 (8), 1013–1033.

11. Grunina, A. S., Recoubratsky, A. V., Barmintsev, V. A., Chudinov, O. S., Abramova, A. B., Chebanov, M. S. (2001). Viable nucleoplasms hybrids produsedby dispermic androgenesis: experiments on sturgeons. 4th International symposium on sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA.

12. Grunina, A. S., Skoblina, M. N., Goncharov, B. F. et. al. (2010). Zhiznesposobnoe ginogeneticheskoe potomstvo sibirskogo osetra, poluchennoe s ispol'zovaniem jajcekletok, ovulirovavshih in vitro // Doklady akademii nauk, 431 (2), 269–273.

13. Recoubratsky, A. V., Grunina, A. S., Barmintsev, V. A., Chudinov, O. S., Abramova, A. B. (2001). RAPD-PCR evidence of dispermic origin of diploid androgenetic sturgeons. 4th International symposium on sturgeon. Oshkosh, Wisconsin. USA.

14. Van Eenennaam, A. L. (1999). Brief communication. Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. Journal of Heredity, 90 (1), 231–233. doi: 10.1093/jhered/90.1.231

15. Flynn, S. R., Matsuoka, M., Reith, M., Martin-Robichaud, D. J., Benfey, T. J. (2006). Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, Acipenser brevirostrum Lesuere. Aquaculture, 253 (1-4), 721–727. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.09.016

16. Fopp-Bayat, D., Kolman, R., Woznicki, P. (2007). Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (Acipenser ruthenus) using UV-irradiated bester sperm. Aquaculture, 264 (1-4), 54–58. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.006

17. Fopp-Bayat, D. (2007). Verification of meiotic gynogenesis in Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt) using microsatellite DNA and cytogenetical markers. Journal of Fish Biology, 71 (sc), 478–485. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01704.x

18. Fopp-Bayat, D. (2010). Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt). Aquaculture, 305 (1-4), 174–177. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.04.011

19. Mims, S. D., Shelton, W. L. (1995). A method for irradiation of shovelnose sturgeon, Scaphirhynchus platorynchus, milt to induce gynogenesis for paddlefish, Polyodon spathula. Proceedings of the Fourth Asian Fishery Forum. Beijing, 395–397.

20. Moan, J., Peak, M. J. (1989). Effects of UV radiation on cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 4 (1), 21–34. doi: 10.1016/1011-1344(89)80099-5

21. Hassanzadeh Saber, M., Noveiri, S. B., Pourkazemi, M., Yarmohammadi, M. (2008). Induction of gynogenesis in stellate sturgeon (Acipenser stellatus Pallas, 1771) and its verification using microsatellite markers . Aquaculture Research, 39 (14), 1483–1487. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02015.x

22. Chebanov, M. S., Galich, E. V. (2013). Rukovodstvo po iskusstvennomu vosproizvodstvu osetrovyh ryb. Prodovol'stvennaja i sel'skohozjajstvennaja organizacija OON. Ankara, 328.

23. Podushka, S. B. (1996). Prizhiznennoe poluchenie ikry u osetrovyh ryb. Biologicheskie resursy i problemy razvitija akvakul'tury na vodoemah Urala i Zapadnoj Sibiri». Tjumen', 115–116.

24. Vasil'eva, L. M., Jakovleva, A. P., Shherbatova, T. G. et. al.; Sudakova, N. V. (Ed.) (2006). Tehnologija i normativy po tovarnomu osetrovodstvu v IV rybovodnoj zone. Moscow: Izd-vo VNIRO, 100.

25. May, B., Krueger, C. C., Kincaid, H. L. (1997). Genetic variability at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in Acipenser and Scaphirinchus. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54 (7), 1542–1547. doi: 10.1139/cjfas-54-7-1542

26. Boom, R., Sol, C., Salimans, M. et. al. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of clinical microbiology, 28, 495–503.

27. Dyman', T. M., Glazko, V. I. (2004). Polimerazna lancjugova reakcija : metodychni rekomendacii'. Bila Cerkva, 62.

28. Rjeznykova-Galashevych, I. S., Stepura, V. V., Shel'ov, A. V. et. al. (2011). Genetychna identyfikacija promyslovyh vydiv ryb: metodychni rekomendacii'. Kyiv: Vydavnychyj c entr NUBiP Ukrai'ny, 35.

29. Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 16 (5), 1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x

30. Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7 (5), 639–655. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x

Дата надходження рукопису 16.11.2015

Малишева Ольга Олексіївна, науковий співробітник відділу молекулярно-діагностичних досліджень, Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, вул. Машинобудівників, 7, смт. Чабани, Києво-Святошинський р-н, Київська обл., Україна, 08162
E-mail: malisheva.sirota@gmail.com

Спиридонов Владислав Геннадійович, доктор сільскогосподарських наук, старший науковий співробітник молекулярно-діагностичних досліджень, Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, вул. Машинобудівників,7, смт. Чабани, Києво-Святошинський р-н, Київська обл., Україна, 08162
E-mail: spyrydonov@ukr.net

Курта Христина Миколаївна, аспірант, кафедра розведення, селекції та репродуктивної біотехнології тварин, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: khrystyna.kurta@gmail.com