

УДК 621.59: 597 114.78

# БИОТЕХНОЛОГИЯ АКВАКУЛЬТУРЫ РЫБ

Л. П. БУЧАЦКИЙ

Институт рыбного хозяйства УААН, Киев, Украина

E-mail: irido1@bigmir.net

Получено 05.03.2013

Обобщены последние достижения биотехнологии аквакультуры рыб и результаты применения современных методов исследований для повышения рыбопродуктивности. Наряду с прикладными аспектами использование современных методов биотехнологии открывает широкие возможности для проведения фундаментальных исследований генетики пола, полиплоидии, отдаленной гибридизации и биологии развития костистых рыб. Приведены примеры применения методов современной биотехнологии для получения трансгенных рыб с увеличенными темпами роста и суррогатных рыб. Подробно рассмотрены методы создания однополых стад самок лососевых и осетровых с большим количеством икры, а также стерильных (триплоидных) рыб. Большое внимание уделено андрогенезу, особенно диспермному, в связи с проблемой сохранения редких и исчезающих видов рыб только из генетического материала спермиев. Освещено получение отдаленных гибридов посредством диспермного андрогенеза и алкилированных ДНК. Рассмотрены методы получения первичных половых клеток рыб, последние достижения в культивировании и использовании стволовых клеток. Описаны методы трансплантации оогоний и сперматогоний для получения суррогатных рыб. Приведены позитивные результаты ксенотрансплантации сперматогоний, а также краткая характеристика криопротекторных протеинов рыб и перспективы их практического использования.

**Ключевые слова:** рыбы, повышение темпов роста, репродукция, стерилизация, андрогенез, стволовые клетки, трансплантация, антифризные протеины.

Все возрастающая численность населения планеты побуждает искать пути повышения производительности сельского хозяйства, улучшать сорта растений и породы животных, в том числе и рыб. Однако традиционные методы селекции уже не в состоянии дать адекватный ответ на решение проблем, связанных с продовольственной безопасностью. По расчетам зарубежных исследователей для обеспечения нормального уровня питания населения планеты в 2025 г. необходимо будет увеличить объем пищевой продукции в 2 раза [1], а вылов рыб в океанах — в 7 раз [2]. Учитывая ограниченные возможности земледелия и истощение рыбных запасов морей и океанов, следует констатировать, что без активизации научно-исследовательских работ в области аква- и марикультуры проблема пищевой безопасности многих стран не будет решена в полном объеме. В настоящее время аквакультура является самым быстрорастущим продовольственным сектором в мире — уже сейчас она поставляет почти половину съедобной рыбы, обеспечивая около 17 кг на душу населения. В мировой аквакультуре выращивают свыше

230 видов рыб, что намного больше по сравнению с сельскохозяйственными животными (коровы, свиньи, овцы, козы и др.)

Значительный вклад в развитие аквакультуры вносят методы современной биотехнологии. Среди них можно выделить следующие: гендерные, получение эмбриональных стволовых клеток, трансгенные, криоконсервация половых продуктов, протеомика, картирование геномов рыб. В 2002 г. был полностью секвенирован геном рыбы *Fugu rubripes* [3], почти завершены работы по секвенированию геномов рыбы Данио, японской медаки и атлантического лосося.

Использование методов современной биотехнологии позволяет увеличивать темпы роста рыб, повышать их резистентность к инфекционным заболеваниям, влиять на репродуктивные процессы, получать улучшенные гибриды.

Многие страны (Канада, Норвегия, Чили, Китай, Япония, Сингапур) проводят интенсивные исследования в области биотехнологии рыб и других водных животных (моллюски, устрицы, крабы, креветки), а также морских растений. В России в рамках технологической платформы «Биотехнология»

существует программа «Морская биотехнология и аквакультура». Сложившемуся направлению исследований в англоязычной литературе было дано название «Голубая волна биотехнологии» [4].

Рассмотрим несколько направлений применения биотехнологий в аквакультуре рыб.

#### *Возрастание темпов роста*

Вслед за работами по увеличению темпов роста, проведенными на мышах [5], были осуществлены подобные работы на рыбах [6, 7]. Трансгенные лососи со встроенным геном гормона роста под промотором участка, кодирующего антифризный протеин океанской бельдюги, росли в 3–5 раз быстрее, нежели в контроле. Некоторые особи, особенно в течение первых месяцев роста, по размерам были в 10–30 раз крупнее контрольных. Трансгенные рыбы не болели, давали полноценное потомство в последующих поколениях и сохраняли свой генотип [8]. В начале нынешнего века получены пользующиеся большим спросом у аквариумистов разноцветные рыбы *Danio rerio* со встроенными генами зеленого и красного флуоресцирующего протеинов [8] (рис. 1).



Рис. 1. Флуоресцентная рыба *Danio rerio*

Трансгенные рыбы со встроенным геном зеленого флуоресцирующего протеина нашли широкое применение в конструировании суррогатных рыб и спермогональной трансплантации [9–13]. Более подробно методы получения трансгенных рыб рассмотрены нами в другой работе [14].

#### *Влияние на репродуктивные процессы*

Интерес к полу некоторых видов рыб, особенно осетровых и лососевых, обусловлен двумя основными причинами. Одна из них — получение однополых самок с целью наработки больших количеств икры, вторая — эти рыбы являются удобной моделью изучения дифференциации пола низших позво-

ночных. Получение однополых самок необходимо также для решения проблемы раннего созревания самцов лососевых рыб (около 60% самцов созревают позже других, что снижает их товарную ценность).

В последние годы количество хозяйств, выращивающих однополых самок, возрастает. Создание таких самок проводят в два этапа — на первом получают однополых самцов-реверсантов, затем, при скрещивании их с обычными самками, — однополых самок. Получение однополых самцов-реверсантов (XX) достигается путем обработки молодых особей рыб низкими дозами андрогенов. Именно в ранний период развития рыб возможна эффективная реверсия пола. Обычно с этой целью используют такие андрогены, как метилтестостерон, метилдегидротестостерон (МДНТ), или гидроксиандростенидион (ОНА). Полученные таким образом самцы состоят из двух типов особей:

1. Фенотипические самцы с женским генотипом (содержат 2X-хромосомы). Эти однополые самцы (реверсанты) при скрещивании с обычными самками дадут в потомстве 100% самок с генотипом XX.

2. Нормальные генетические самцы (содержат как X-, так и Y-хромосомы).

Эти два вышеуказанных типа самцов фенотипически не различимы между собой. Выявить различия между ними можно лишь при гистологических исследованиях либо реципрокным скрещиванием, что занимает много времени. Поэтому в последние годы для ускоренного выявления самцов-реверсантов (с XX-генотипом) во многих странах были разработаны молекулярно-биологические методы, основанные на ДНК-технологиях.

В одном из форелевых хозяйств Черновицкой области нами было установлено, что к смене пола радужной форели приводило комбинированное скармливание двух форм тестостерона. Об этом свидетельствовали как результаты метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), так и изменения в гонадах экспериментальных особей рыб — у некоторых из них в процессе реверсии одновременно присутствовали как женские, так и мужские половые железы (рис. 2), некоторые особи форели были стерильны. Как показали результаты проведенных исследований, специфические олигонуклеотидные праймеры к фрагменту Y-хромосомы радужной форели амплифицировали ожидаемый по размеру фрагмент ДНК. Длина ПЦР-продукта составила около 800 пар нуклеотидов. Таким образом с помощью метода ПЦР были идентифицированы генотипы самцов радужной форели.



Рис. 2. Гонады радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в процессе реверсии пола

Следует отметить, что применение ПЦР для выявления реверсантов стало возможным после обнаружения канадскими исследователями у чавычи и озерной форели повторяющихся (около 200 раз) последовательностей ДНК размерами 8, 16, 24 и 32 т. п. н. на Y-хромосоме [15, 16]. Была разработана ПЦР-диагностика самцов, широко используемая в современном рыбоводстве. С целью диагностики ДНК выделяют из плавников или из крови, и рыба остается живой. В настоящее время разработано большое количество молекулярных маркеров для различных видов лососевых рыб. Для ручьевой форели известны такие маркеры, как Omy1, Omy8, Omy9; для чавычи — Oty1, Oty3 и др. Было установлено, что Oty1 является частью большого фрагмента Oty8, который повторяется в геноме в виде 300 копий [17, 18].

#### Стерилизация рыб

Технику стерилизации используют для производства рыб, имеющих дополнительную копию хромосом. Преимущество стерильных организмов заключается в том, что они используют энергию для роста, а не для наработки спермы или икры. Если яйца рыб вскоре после оплодотворения подвергнуть тепловой обработке или давлению, они сохраняют дополнительную хромосому. Вместо двух хромосом такие особи содержат три. Самки этих рыб стерильны. Альтернативным способом получения стерильных особей рыб является блокирование мРНК гонадотропинвысвобождающего протеина (GnRH) с помощью антисмысловых РНК или рибозимов [19].

В последнее время для получения триплоидных (стерильных) рыб широко применяют реверсантов, а также гиногенетических особей. В некоторых странах Европы (Англия, Франция и др.) приняты законы, запрещающие выпускать диплоидную форель и других лососей в реки с целью

предотвращения возможной гибридизации с дикой форелью.

Установлено, что самки триплоидной форели в половозрелом возрасте по массе на 30% больше диплоидных, что является следствием экономии энергии, необходимой для созревания икры. У триплоидных самцов форели этого же возраста существенного увеличения массы тела не наблюдается.

Таким образом, манипулируя пloidностью, можно получать стерильных, быстрорастущих гомозиготных рыб в аквакультуре. Основная идея пloidности — позволить хромосоме реплицироваться, но затормозить деление клетки с помощью так называемого «шока». Для этих целей в производстве используют температуру или высокое давление (500–600 кг/см<sup>2</sup> в течение 5–10 мин, в зависимости от вида рыб). В результате такого воздействия разрушается веретено деления, формируется женский пронуклеус и яйцо становится не гаплоидным, а диплоидным. Последующее его оплодотворение нормальной спермой продуцирует триплоид. Получение триплоидных рыб осуществляется благодаря тому, что второе мейотическое деление завершается вне тела самки рыб после оплодотворения. Другой метод создания полиплоидов — подавление первого деления дробления на уровне зиготы (рис. 3).

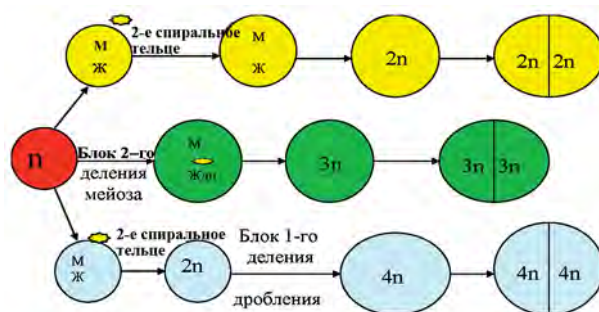


Рис. 3. Схема получения ди-, три- и тетраплоидных рыб

В настоящее время триплоиды с успехом применяют в аквакультуре многих стран во избежание контаминации с аборигенными видами. Так, в США было разрешено разведение продуктивных триплоидных карпов, а также тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas*, поскольку аборигенная вирджинская устрица почти исчезла в прибрежных водах на востоке этой страны в результате многочисленных вспышек протозойной инфекции.

Важным моментом в работе с триплоидными рыбами является их идентификация.



С этой целью обычно используют проточный цитофлюориметр. У рыб берут кровь, клетки обрабатывают флюорохромом и по величине спектров поглощения отличают диплоидных рыб от триплоидов. Однако прибор дорогой и имеется лишь в специализированных лабораториях, куда доставляют кровь из рыбных хозяйств. Триплоидов можно также определять по количеству ДНК в ядрах эритроцитов методом денситометрии с помощью окрашивания препаратов по Фельгену или по размерам ядер [20]. Следует отметить, что получение триплоидов сопровождается большими отходами эмбрионов и деформацией их тела, уродствами. В Евросоюзе для решения этой проблемы и повышения эффективности триплоидов с 2000 г. действует программа SALMOTRIP.

#### *Межвидовые гибриды и андрогенез*

В последнее время андрогенез привлекает все большее внимание в связи с проблемой сохранения редких и исчезающих видов из генетического материала спермиев. Технология криоконсервирования спермы рыб хорошо разработана [21]. Задача же длительного хранения яйцеклеток и зародышей рыб пока еще не решена. Важное значение для сохранения исчезающих видов рыб представляют работы по производству андрогенов лососевых и осетровых рыб. В этом плане осетры представляют довольно удобный объект, поскольку их яйцеклетки имеют несколько микропиле (обычно 6–8) и у них отсутствуют механизмы, препятствующие проникновению в яйцеклетку большого количества спермиев (нерест у них происходит на быстром течении воды, и большое количество микропиле способствует успешному проникновению спермиев в икру рыб).

В 1995 г. были опубликованы две статьи российских [22] и японских [23] ученых о разработке метода диспермного андрогенеза осетровых и лососевых рыб. Для оптимизации условий ядерно-цитоплазматической совместимости А. С. Груниной и А. В. Рекурбатским [24, 25] были испытаны родительские пары разной пloidности для скрещивания. При наличии больших различий в количестве хромосом андрогенетические гибриды погибали, т. е. необходимо было скрещивать диплоидных рыб с диплоидными, а тетраплоидных — с тетраплоидными. Другие комбинации этих рыб между собой, а также с веслоносом оказались нежизнеспособными. Нежизнеспособными были и гибриды между стерлядью и севрюгой, что свидетельствует о наличии малоизученных факторов

несовместимости. Следует отметить, что такие межвидовые гибриды осетровых рыб были получены впервые. В последние годы метод диспермного андрогенеза нашел широкое применение и для других рыб [26, 27].

С целью получения отдаленных гибридов между карпом и лососем нами были проведены опыты с использованием алкилированной ДНК в аквакультуре [28, 29]. Установлено, что средняя масса тела рыб в эксперименте в два раза превышала массу контрольных рыб. У гибридных рыб наблюдался повышенный уровень фолликулстимулирующего гормона и эстрадиола и пониженный — прогестерона.

#### *Первичные половые клетки рыб как объект для биотехнологии*

У рыб половые недифференцированные гонады обладают большой пластичностью, благодаря чему их пол можно легко изменять с помощью экзогенных стероидных гормонов [30–33]. После половой дифференциации пластичность гонад у рыб снижается, однако она остается довольно высокой у первичных половых клеток, что имеет большое значение для разработок новых биотехнологий для аквакультуры.

Первичными половыми клетками (ППК) называются клетки, потомки которых дают начало исключительно гаметам. В англоязычной литературе их обычно именуют примордиальными и обозначают PGC (от *primordium germ cells*). ППК представляют собой диплоидные клетки, способные к митотическим делениям. У многих животных ППК способны к миграции и вследствие этого заселяют зачатки гонад, которые закладываются и формируются независимо, а иногда и на значительном расстоянии от мест возникновения половых клеток.

У костистых рыб во время формирования зачатков гонад гонады эмбрионов изначально состоят из соматических клеток, в то время как ППК появляются в полости тела рыб в экстрагонадной области (рис. 4). Соматические клетки гонад со временем начинают продуцировать хемокиновый фактор (SDF-1). В это время ППК, находящиеся на расстоянии от зачаточных гонад, начинают продуцировать рецептор к вышеуказанному фактору — CXCR-4. В результате ППК начинают притягиваться к SDF-1 и мигрируют к оболочке гонад, используя псевдоподии [34]. Во время движения эти клетки активно делятся, благодаря чему их численность возрастает почти в 50 раз. Способность ППК рыб к хемотаксису ныне активно используют в биоинженерии и биотехнологии.

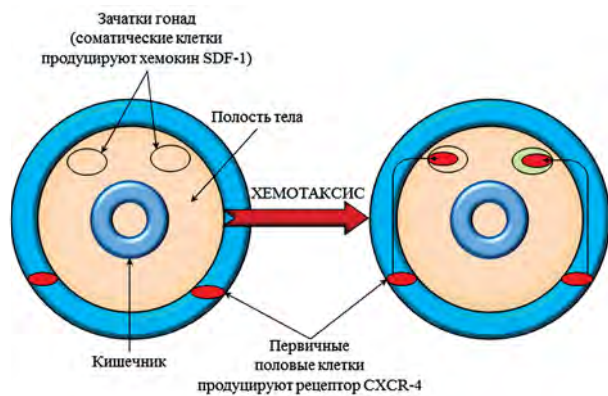


Рис. 4. Схема формирования гонад костистых рыб

Для выделения ППК в качестве модельных систем обычно используют рыб, эмбрионы которых имеют большие размеры. Например, для этой цели японскими исследователями была выбрана радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) [35]. Выключившиеся эмбрионы этой рыбы достигают длины 15 мм, что вполне достаточно для последующих манипуляций. Кроме того, радужная форель является гонохористическим видом (никогда не меняет пол в процессе развития) и имеет четко выраженный половой диморфизм (система XY). Дифференциация пола у этого вида завершается через 70 дней после оплодотворения при температуре 10 °С [36].

Для мечения ППК различных видов рыб в настоящее время применяют трансгенную технику с использованием зеленого флуоресцирующего протеина (*Gfp*). В опытах японских исследователей из Токийского университета морских наук и технологий ген *Gfp* был встроен под промотором гена *vasa*, который способен экспрессироваться только в ППК различных видов животных [37], в том числе и форели [38]. Конструкцию *vasa-Gfp* путем микроинъекций вводили в цитоплазму оплодотворенных яиц, вследствие чего были получены трансгенные особи форели, ППК которых легко выявлялись благодаря ярко-зеленому свечению [39].

Включение в состав конструкции нетранслируемого 3'-участка гена *vasa* было обязательным условием для выявления ППК форели, меченной *Gfp* [39]. Аналогичные результаты были получены и на рыбе *Danio rerio* [40, 41]. Это свидетельствует о важной роли этого участка гена *vasa* для стабилизации мРНК, специфической для ППК рыб.

После извлечения под люминисцентным микроскопом из зачатков гонад эмбрионов трансгенной форели около 10 светящихся

клеток ППК их вводили внутривентриально выключившимся эмбрионам форели, выступавшим в роли реципиентов. У таких особей форели отсутствует система антителообразования, т. е. они аналогичны иммунодефицитной линии мышей *nude*. Через 20–30 дней путем хемотаксиса эти клетки достигали оболочки гонад и успешно в нее внедрялись. После этого меченые ППК вступали в процесс гаметогенеза и продуцировали функциональные гаметы. У реципиентных самок форели наступал оогенез, а у самцов, соответственно, сперматогенез. Следует отметить, что интеграция ППК возможна лишь в течение двух недель после выклева личинок, поскольку позднее реципиент теряет способность притягивать к себе донорные ППК.

Кроме ППК, зеленая флуоресценция была выявлена в сперматогониях [42, 43], оогониях и ооцитах [39] реципиентных рыб.

#### Трансплантация сперматогоний

В эмбриологии гониями называют ППК, заселившие зачатки гонад. Гонии, как и ППК, являются диплоидными клетками и обладают способностью к митотическим делениям. Гонии мужских гонад называют сперматогониями, а женских — оогониями. Этап развития, который представлен ППК и гониями, — это период размножения половых клеток. После него следует период созревания, во время которого клетки полового пути теряют способность к митотическим делениям. Они вступают на путь превращения в гаплоидные клетки, претерпевая сложный процесс редукции числа хромосом в ходе мейоза.

До настоящего времени изучение у рыб гонияльных зародышевых клеток, таких как сперматогонии и оогонии, проводилось только на уровне гистологии и эндокринологии [44] из-за отсутствия методов выделения ППК и маркеров для их идентификации.

В последние годы было установлено, что сперматогонии рыб, изолированные из взрослых семенников, также продуцируют CXCR-4, которому принадлежит ключевая роль в хемотаксисе ППК [34]. Это свойство было использовано для трансплантации сперматогониев во взрослые особи форели [45]. Сперматогонии получали от взрослых трансгенных особей, несущих конструкцию *vasa-Gfp*. Следует отметить, что у форели, как и у других рыб, существуют сперматогонии двух типов — А и Б. Сперматогонии А-типа расположены на периферическом участке тестикулярной лобулы, и каждый такой сперматогоний окружен клетками

Сертоли. В процессе дифференциации эти клетки пролиферируют и со временем превращаются в Б-тип сперматогоний.

В опытах по трансплантации сперматогоний форели было установлено, что зеленое свечение присутствовало только в сперматогониях А-типа. После этого несколько тысяч сперматогониев А-типа с помощью проточного сортировочного цитофлюориметра были изолированы и инъецированы внутривентриально выключившимся свободным эмбрионам форели. Результаты опытов показали, что сперматогонии донорной форели успешно мигрировали к зачаткам гонад и внедрялись в них, в результате чего у реципиентной форели вырабатывалась полноценная сперма. Учитывая тот факт, что у половозрелой форели один сперматогоний продуцирует 512 сперматозоидов [46], а также общее количество произведенной трехлетней реципиентной форелью спермы (около 40 млн.), было сделано заключение, что сперматогонии А-типа содержат в своем составе популяцию стволовых клеток, обладающих неограниченной способностью к самообновлению и дифференциации в функциональную сперму.

У реципиентных самок трансплантированные в полость тела личинок форели сперматогонии через 2 года продуцировали полноценную икру [47–49].

С целью выяснения возможности сперматогоний форели, несущих XY хромосомы, продуцировать как X-, так и Y-икру были проведены эксперименты, в которых реципиентные самки с интегрированными сперматогониями спаривались с обычными XY-самцами. В потомстве F1 соотношение самцов к самкам было 3:1 (рис 5).

В потомстве F2 самцов спаривали с обычными XX-самками. Результаты опытов

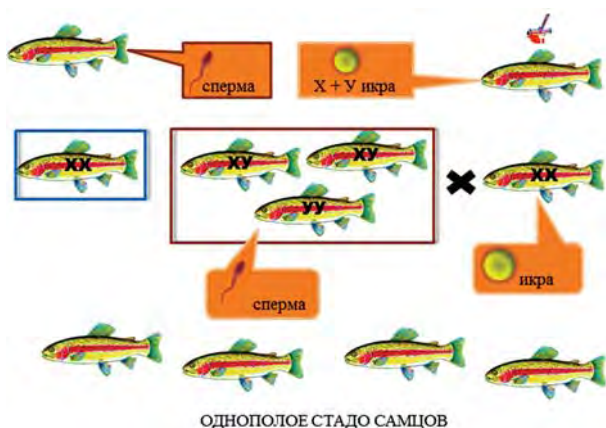


Рис. 5. Анализ потомства трансплантированных сперматогоний

показали, что одна треть самцов продуцирует только однополых самцов, т. е. они содержат YY-хромосомы, а также, что X- и Y-хромосомы у рыб очень похожи, за исключением участка, определяющего мужской пол. Проведенные исследования свидетельствуют о высокой половой пластичности зародышевых клеток рыб и открывают возможность индуцирования реверсии пола сперматогоний у реципиентных самок рыб. Наряду с форелью прямая трансплантация сперматогоний в зрелые яичники реципиентных рыб была осуществлена у тилапий (*Oreochromis niloticus*) [50–52] и у атерин (*Odontesthes hatchery*) [53].

В последние годы разработан метод идентификации поверхностного протеина сперматогонияльных клеток [54]. С помощью антител и проточной цитометрии этот метод дает возможность получать сперматогонии рыб в больших количествах. Были разработаны также методы культивирования сперматогоний японской медаки (*Orizias latipes*) в условиях *in vitro* [55]. Культивируемые клетки этой рыбы подвергались мейозу и сперматогенезу, продуцируя подвижные сперматозоиды.

#### Ксенотрансплантация сперматогоний

Установлено, что развитие донорных сперматогоний возможно не только в организме стерильных триплоидных самцов рыб одного и того же вида, но и в близкородственных видах (ксенотрансплантация). Это имеет важное значение для сохранения видового разнообразия популяций рыб из естественных водоемов путем криоконсервации зародышевых клеток и для получения суррогатных рыб [47–49, 56–60]. Гаметы рыб, имеющих большие размеры и продолжительный период полового созревания, можно получать за сравнительно короткое время в суррогатных рыбах, имеющих небольшие размеры и непродолжительный период полового созревания. Достичь этого можно с помощью ксенотрансплантации сперматогоний целевых видов рыб в подходящие реципиенты (рис. 6).

Такая технология экономически целесообразна, поскольку сокращает площади для разведения рыб в аквакультуре и экономит значительные ресурсы и время. Кроме того, она имеет большое значение для сохранения видового разнообразия популяций рыб из естественной среды путем применения криоконсервированных зародышевых клеток. Схема опыта сохранения исчезающих видов рыб представлена на рис. 7.



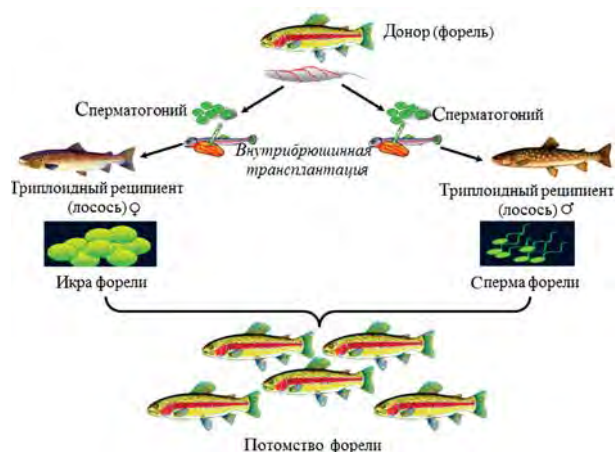


Рис. 6. Ксенотрансплантация сперматозоидов

### Трансплантация ооцитов

Трансплантация ооцитов из трансгенных самок форели, несущих *Vasa-Gfp*, выключившимся самцам форели показала, что донорные ооциты также обладают способностью внедряться в семенники самцов и пролиферировать [39]. Через 130 дней количество донорных ооцитов в реципиентных гонадах увеличивалось в 40 раз. Через 2 года после трансплантации реципиентным самкам донорные ооциты форели дифференцировались в функциональную икру. У реципиентных самцов такие ооциты дифференцировались в сперматогонии и продуцировали сперму. Положительные результаты были получены также при трансплантации ооцитов триплоидным самцам форели, которые обычно содержат незначительное количество анеуплоидной спермы, не способной оплодотворять икру [56, 57]. Было подсчитано, что в этих экспериментах один ооцит продуцировал около 1 млн. сперматозоидов. Результаты опытов также показали, что донорные ооциты трансгенной форели дифференцировались в реципиентных гонадах в сперматогональные стволовые клетки, способные дифференцироваться в сперму и обладающие неограниченной возможностью к самообновлению. Недавно ооцитные стволовые клетки были изучены у медаки [58]. Результаты вышеуказанных экспериментов свидетельствуют о высокой половой пластичности сперматогоний А-типа и ооцитов, изолированных из гонад рыб после полопределяющего периода (около 2 нед), и о том, что пол зародышевых клеток рыб определяется исключительно соматическим микроокружением.



Рис. 7. Способ сохранения редких и исчезающих видов рыб

### Стволовые клетки рыб и полуклонирование

Уникальная способность стволовых клеток к самообновлению, т. е. продуцированию множества идентичных друг другу и материнской стволовой клетке дочерних клеток, отличает их от других клеток. Другой особенностью этих клеток является способность продуцировать специализированные клетки. Эти их свойства представляют интерес как для изучения биологии развития, так и для применения в области медицины и биотехнологии животных, в особенности рыб.

Успех в работе со стволовыми клетками рыб был достигнут в 90-е гг. прошлого века благодаря внедрению фидерной (поддерживающей) техники культивирования. Такие работы были проведены с клетками, полученными из полосатого Данио (*D. rerio*) [61], а также из медаки (*O. latipes*) [62].

В качестве поддерживающих субстанций обычно используют эмбриональные фибробласты рыбы Данио, клетки печени грызунов, почек радужной форели [61, 63–66].

В Национальном университете Сингапура из медаки получены гаплоидные стволовые клетки [62]. С этой целью сперму медаки облучали ультрафиолетом в умеренных дозах, с тем чтобы разрушить ядра, но сохранить способность влиять на поверхность икры [67]. Генетически инактивированную таким образом сперму смешивали со зрелыми ооцитами для искусственного оплодотворения, получая икру с гаплоидными женскими ядрами. С полученных эмбрионов рождались только гиногенетические самки. На стадии средней бластулы из гиногенетических гаплоидных эмбрионов получали отдельные клетки, пригодные для культивирования в условиях *in vitro* [68]. Условия

культивирования этих клеток не отличались от диплоидных [69].

В последние годы разработаны методы культивирования стволовых клеток рыб в условиях *in vitro* без применения фидерных методов [55, 70]. Обязательным компонентом питательной среды в таких методах является наличие в ней рыбьего эмбрионального экстракта, фактора роста фибробластов и рыбьей сыворотки, способных поддерживать самообновление клеток на поверхности плашек, покрытых желатином. Бесфидерная культура стволовых клеток уже разработана для дорады (*Sparus aurata*), красного морского карася (*Pagrus major*), японского морского судака (*Lateolabrax japonicus*), белого морского окуня (*Lates calcalifer*), атлантической трески (*Gadus morhua*), калкана (*Scophthalmus maximus*) [71–76]. Следует отметить, что первая работа по трансплантации ядер из культивированных *in vitro* клеток рыб была опубликована китайскими учеными еще в 1986 г., за 10 лет до известных опытов английских исследователей с овцой Долли [77]. Длительное время она была незамеченной из-за публикации на китайском языке. Англоязычный вариант этой статьи был опубликован в международном журнале лишь в 2010 г. [78].

Как упоминалось выше, сингапурскими исследователями были получены гаплоидные клетки медаки [62], которые можно легко использовать для трансплантации ядер в икру без этапа удаления ядер. По этому методу, называемому полуклонированием, митотические гаплоидные ядра переносят в зрелую икру без удаления ее ядер, что приводит к комбинации гаплоидных соматических ядер одного родителя и гаплоидных гаметных ядер другого. Такая икра будет мозаичной. Путем введения стволовых гаплоидных клеток медаки в зрелые ооциты этой рыбы была получена первая в мире полуклонированная рыба, названная Холли [79]. Она имела нормальную плодовитость, потомство на протяжении трех поколений было вполне жизнеспособным.

В отличие от обычной ядерной трансплантации из соматических клеток, полуклонирование является весьма эффективным. Вклад в оплодотворение по этому методу вносят оба родителя — 50% потомков генетически идентичны одному из родителей и 75% — друг другу. Такой метод является более естественным и может применяться для лечения бесплодия в медицине.

### Применение нанобиотехнологий

В современной аквакультуре все более широкое применение находят нанотехнологические методы. Например, с помощью наносенсоров можно выявить в инфекционном материале одну вирусную частицу [80]. Для очистки воды в аквакультуре с успехом применяют антибактериальные частицы, инактивирующие бактерии непосредственно либо фотодеградацией патогена с помощью ультрафиолета [81, 82]. Нами была показана возможность фотодеградации в воде хлориоидовируса с помощью наночастиц на основе фуллерена C<sub>60</sub> [83, 84], адаптирован иммунный сенсор для выявления ретровируса рыб у щук из днепровских водохранилищ [85, 86].

### Криопротекторные свойства антифризных протеинов рыб

Антифризные протеины — это протеины, вырабатываемые в печени некоторых видов boreальных рыб и в организме многих беспозвоночных, которые содержат в своем составе большое количество аланина (таблица). Они эффективно защищают организмы рыб и других водных животных от замерзания плазмы крови или гемолимфы при отрицательных значениях температуры воды. Антифризные протеины специфически адсорбируются на поверхности образующихся кристалликов льда, предотвращая тем самым их дальнейший рост, взаимодействуют с мембранами клеток, а также способны ингибировать процессы рекристаллизации. Эти свойства обусловлены уникальной четвертичной структурой антифризных протеинов — по сравнению с известными в настоящее время криопротекторами они в 500 раз более эффективно снижают температуру замерзания различных растворов, а также биологических объектов.

В процессе длительной эволюции костистые рыбы выработали специфические механизмы снижения точки замерзания крови и других экстраклеточных биологических жидкостей без существенного изменения значений их осмотического давления. Особенно развиты такие механизмы у рыб, обитающих в холодных морских водах. Точка замерзания морской воды составляет около  $-1,8^{\circ}\text{C}$ . Экспериментально было установлено, что рыбы, в плазме которых отсутствуют антифризные протеины, замерзают и при более высоких температурах, в отличие от рыб, имеющих в плазме крови высокие уровни антифризных протеинов и способных перезимовать в суровых условиях



## Характеристика антифризных протеинов рыб

Тип протеина	Рыба	Мол. масса (Да)	Первичная структура	Вторичная структура	Третичная структура	Протеиновые компоненты	Копии генов
AFP I	Зимняя камбала; короткошипый бычок	3,3–4,5	Повторы из 11aa	Полярные альфа-спирали	100%-я спираль	7	80–100
AFP II	Малоглазый алет; корюшка; сельдь	11–24	Много цистина; дисульфидные мостики	Бета-слои	Нет данных	2–6	15
AFP III	Бельдюга; морской волк	6,5	Обычная	Бета-сэндвичи	Нет данных	12	30–50
AFP IV	Длинношипый бычок	12,23	17% глутамина	Неполярные альфа-спирали	4-спиральный антипараллельный пакет	1	Нет данных
AFGP	Антарктические нототениевые; треска	2,6–33	(Аланин-аланин-треонин) <sub>n</sub> дисахарид	Разветвленная	Нет данных	8	Нет данных

окружающей среды. Однако лососевые рыбы, а также другие коммерчески важные виды рыб не способны синтезировать антифризные протеины. Поэтому из-за резкого переохлаждения в зимние месяцы у восточного побережья Канады, где ежегодная прибыль от торговли продуктами аквакультуры достигает 100 млн. долл. США, гибнет большое количество лососей, выращиваемых в садках [15].

В последнее время в вышеуказанных странах были предприняты усилия по получению трансгенных лососей со встроенными генами антифризных протеинов рыб. Результаты этих экспериментов показали высокую эффективность таких подходов в аквакультуре — трансгенные лососи отличались повышенной устойчивостью к низким температурам, что открывает возможность выращивания лососей и в северных регионах. Аналогичные результаты были получены и в форелеводстве.

В 90-е г. прошлого века появились экспериментальные работы, свидетельствующие о возможности использования антифризных протеинов рыб при криоконсервации половых клеток, а также различных тканей и органов животных и человека. Ооциты быков, хранившиеся в течение суток в присутствии антифризных протеинов рыб, были устойчивы к пониженным температурам (4 °C) и функционально не отличались от контрольных [87]. Один из возможных гипо-

тетических механизмов криопротекторных свойств антифризных протеинов рыб — их участие в блокировании усиленного проникновения ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клеток в случае повышенного гидролиза фосфолипидов при низких температурах [88].

Другая гипотеза основывается на прямом защитном влиянии антифризных протеинов рыб на мембраны клеток. В серии экспериментов с липосомами было показано, что антифризные протеины способны эффективно сохранять целостность липидного бислоя липосом [89]. Эти протеины защищают запасы крови, предназначенной для переливания, от так называемой «холодовой активации», когда через разрывы эритроцитарных мембран содержимое клеток вытекает наружу. Наряду с этим антифризные протеины рыб широко применяются в трансплантационных технологиях и в криохирургии [90]. В последние годы получила распространение практика криохирургии при удалении солидных опухолей человека. При этом с помощью антифризных протеинов рыб можно увеличивать количество разрушенных опухолевых клеток пациентов.

Таким образом, современные методы биотехнологии находят широкое применение как для повышения производительности рыбоводства, так и для изучения фундаментальных проблем биологии развития.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vasil I. K. Biotechnology and food security for the 21st century: a real-world perspective // Nat. Biotechnol. — 1998. — V. 16. — P. 399–400.
2. Hew C. L., Fletcher G. L. The role of aquatic biotechnology in aquaculture // Aquaculture. — 2001. — V. 197. — P. 191–204.
3. Aparicio S., Chapman J., Stupka E. et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes* // Science. — 2002. — V. 297 (5585). — P. 1301–1310.
4. DaSilva E. J. The colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind // Electr. J. Biotechnol. Edit. art. — 2004. — V. 7, N 3. — P. 1.
5. Palmiter R. D., Brinste R. L., Hammer R. E. et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes // Nature. — 1982. — V. 300. — P. 611–615.
6. Du S. J., Gong Z., Fletcher G. L. et al. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an all fish chimeric growth hormone gene construct // Biol. Technol. — 1992. — V. 10, N 2. — P. 176–181.
7. Rasmussen R. S., Morrissey M. T. Biotechnology in aquaculture: transgenic and polyploidy // Comprehensive reviews in food science and food safety. — 2007. — V. 6. — P. 2–16.
8. Wan H., He J., In B. et al. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein receptor genes, *gfp* and *rfp* // Mar. Biotechnol. — 2002. — V. 4, N 2. — P. 146–154.
9. Takeuchi Y., Yoshizaki G., Kobayashi T. et al. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter // Biol. Reprod. — 2002. — V. 67. — P. 1087–1092.
10. Yoshizaki G., Tago Y., Takeuchi Y. et al. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae // Ibid. — 2005. — V. 73. — P. 88–93.
11. Yamaha E., Saito T., Goto-Cazeto R. et al. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes // J. Sea Res. — 2007. — V. 58. — P. 8–22.
12. Shikina S., Ihara S., Yoshizaki G. Culture conditions for maintaining the survival and mitotic activity of rainbow trout transplantable type A spermatogonia // Mol. Reprod. Dev. — 2008. — V. 75. — P. 529–537.
13. Alvarez M. C., Bejar J., Chen S. et al. Fish ES cell and applications to biotechnology // Marine Biotechnol. — 2007. — V. 9. — P. 117–127.
14. Бучацький Л. П. Трансгенез у риби // Рибн. госп. — 2000. — Вип. 56-57. — С. 51–61.
15. Devlin R. H., Nagahama Y. Sex determination in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // Aquaculture. — 2002. — V. 208 — P. 191–364.
16. Devlin R. H., Park L., Sakhrani D. M. et al. Variation of Y-chromosome markers in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 2005. — V. 62. — P. 1386–1399.
17. Brunelli J. P., Wertzler K. J., Sundin K. et al. Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and chinook salmon // Genome. — 2008. — V. 51. — P. 739–748.
18. Lanes C. F., Sampaio L. A., Marins L. F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* // Theriogenology. — 2009. — V. 71. — P. 525–533.
19. Maclean N., Laight R. J. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. // Fish. — 2000. — N 1. — P. 146–172.
20. Гомельський Б. И., Грунина А. С. Искусственная полиплоидия у рыб и возможности ее использования в рыбоводстве. Обзорная информация ЦНИИТЭИРХ. — 1988. — Вып. 1. — С. 1–25.
21. Горбунов Л. В., Бучацький Л. П. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных. — ВПЦ Київ. ун-т., 2005. — 325 с.
22. Грунина А. С., Рекубратский А. В., Neyfakh A. A. Induced diploid androgenesis in sturgeons // Sturgeon Quart. — 1995. — V. 3, N 3. — P. 6–7.
23. Araki K., Shinma H., Nagoya H. et al. Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1995. — V. 52. — P. 892–896.
24. Грунина А. С., Рекубратский А. В. Андрогенез у рыб, или только из мужского семени // Природа. — 2006. — № 11. — С. 25–31.
25. Грунина А. С., Рекубратский А. В., Цветкова Л. И. и др. Диспермный андрогенез у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы: получение андрогенетического потомства сибирского осетра и андрогенетических гибридов между сибирским и русским осетрами // Онтогенез. — 2011. — Т. 42, № 2. — С. 133–145.
26. Kirankumar S., Pandian T. J. Use of heterologous sperm for the dispermic induction of androgenesis in barb // J. Fish Biol. — 2004. — V. 64. — P. 1485–1497.
27. Clifton J. D., Pandian T. J. Dispermic induction of interspecific androgenesis in the fish, Buenos Aires tetra using surrogate eggs widow tetra // Curr. Sci. — 2008. — V. 95, Iss. 1. — P. 64.
28. Бучацький Л. П., Потопальский А. И., Зайка Л. А. та ін. Застосування алкілованої ДНК для виведення віддалених гібридів риби // Тваринництво Укр. — 2010. — № 4. — С. 21–23.

29. Бучацький Л. П., Потопальський А. І, Заїка Л. А. та ін. Патент на корисну модель № 44303 «Спосіб отримання гібридів риб». Зареєстровано 25.09.2009.
30. Melamed P., Gong Z., Fletcher G. et al. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture // Aquaculture. — 2002. — V. 204. — P. 255–269.
31. Yoshizaki G., Ichikawa M., Hayashi M. et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout // Development. — 2010. — V. 137. — P. 1227–1230.
32. Метальникова К. В. Потомство реверсанта стальноголового лосося // Рыбн. хоз. — 1991. — № 12. — С. 59–61.
33. Павлов Е. Д., Нгуен Вьет Туи, Нгуен Ту Ту. Состояние половых желез молоди триплоидной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях южного Вьетнама при искусственной инверсии пола // Вопр. ихтиол. — 2010. — Т. 50, № 5. — С. 675–684.
34. Raz E., Reichman-Fried M. Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. // Curr. Opin. Genet. Develop. — 2006. — V. 16. — P. 355–359.
35. Yoshizaki G., Sakatani S., Tominaga H. et al. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage // Mol. Reprod. Develop. — 2000. — V. 55. — P. 364–371.
36. Takashima F., Patino R., Nomura M. Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout // Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. — 1982. — V. 46. — P. 1317–1322.
37. Raz E. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development // Genome Biol. — 2000. — N 1. — P. 1017.
38. Yoshizaki G., Takeuchi Y., Sakatani S. et al. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter // Int. J. Dev. Biol. — 2000. — V. 44. — P. 323–326.
39. Yoshizaki G., Fujinuma K., Iwasaki Y. et al. Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources // Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genom. Proteom. — 2011. — V. 6, Iss. 1. — P. 55–61.
40. Knaut H., Steinbeisser H., Schwarz H. et al. An evolutionary conserved region in the *vasa* 3' UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish // Curr. Biol. — 2002. — N 12. — P. 454–466.
41. Wolke U., Weidinger G., Köprunner M. et al. Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish // Curr. Biol. — 2002. — V. 12. — P. 289–294.
42. Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y. et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — V. 103. — P. 2725–2729.
43. Yano A., Suzuki K., Yoshizaki G. Flowcytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the greenfluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions // Biol. Reprod. — 2008. — V. 78. — P. 151–158.
44. Schulz R. W., de França L. R., Lareyre J. J. et al. Spermatogenesis in fish // Gen. Comp. Endocrinol. — 2010. — V. 165. — P. 390–411.
45. Yoshizaki G., Ichikawa M., Hayashi M. et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout // Development. — 2010. — V. 137. — P. 1227–1230.
46. Loir M. Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells // Mol. Reprod. Dev. — 1999. — V. 53. — P. 422–433.
47. Okutsu T., Yano A., Nagasawa K. et al. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation // J. Reprod. Develop. — 2006. — V. 52. — P. 685–693.
48. Okutsu T., Shikina S., Kanno M. et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents // Science. — 2007. — V. 317. — P. 1517.
49. Okutsu T., Takeuchi Y., Yoshizaki G. Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents / Tsukamoto K. (Ed). Fisheries for global welfare and environment. 5-th World Fisheries Congress. — 2008. — P. 209–219.
50. Lacerda S. M., Batlouni S. R., Silva S. B. et al. Germ cell transplantation in fish: the Nile-tilapia model // Anim. Reprod. — 2006. — N 3. — P. 146–159.
51. Lacerda S. M., Batlouni S. R., Assis L. et al. Germ cell transplantation in tilapias (*Oreochromis niloticus*) // Cybium. — 2008. — V. 32. — P. 115–118.
52. Lacerda S. M., Batlouni S. R., Costa G. M. et al. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model // PLoS One. — 2010. — N 5. — e 10740.
53. Majhi S. K., Hattori R. S., Yokota M. et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines // Ibid. — 2009. — N 4. — e 6132.
54. Nagasawa K., Shikina S., Takeuchi Y. et al. Lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout // Biol. Reprod. — 2010. — V. 83 (4). — P. 597–606.
55. Hong Y., Liu T., Zhao H. et al. Establishment of a normal medaka fish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — V. 101. — P. 8011–8016.



56. Carrasco L. A., Doroshov S., Penman D. J. et al. Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // J. Reprod. Fertil. — 1998. — V. 113. — P. 197–210.
57. Lin S., Long W., Chen J. et al. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — V. 89. — P. 4519–4523.
58. Nakamura S., Kobayashi K., Nishimura T. et al. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka // Science. — 2010. — V. 328. — P. 1561–1563.
59. Nobrega R. H., Batlouni S. R., Franca L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish // Fish Physiol. Biochem. — 2009. — V. 35. — P. 197–206.
60. Collares T., Campos V. F., Seixas F. K. et al. Transgene transmission in south american catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer // J. Biosci. — 2010. — V. 35. — P. 39–47.
61. Collodi P., Kamei Y., Ernst T. et al. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues // Cell. Biol. Toxicol. — 1992. — N 8. — P. 43–61.
62. Yi M., Hong N., Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells // Science. — 2009. — V. 326. — P. 430–433.
63. Sun L., Bradford C. S., Ghosh C. et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. — 1995. — N 4. — P. 193–199.
64. Fan L., Crodian J., Collodi P. Culture of embryonic stem cell lines from zebrafish // Meth. Cell Biol. — 2004. — V. 76. — P. 151–160.
65. Ma C., Fan L., Ganassin R. et al. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 2461–2466.
66. Alvares M. C., Bejar J., Chen S. et al. Fish ES cells and applications to biotechnology // Marine Biotechnol. — 2006. — V. 9. — P. 117–127.
67. Li Z., Bhat N., Manali D. et al. Medaka cleavage embryos are capable of generating ES-like cell cultures // Int. J. Biol. Sci. — 2011. — N 7. — P. 418–425.
68. Yi M., Hong N., Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells // Science. — 2009. — V. 326. — P. 430–433.
69. Hong N., Li Z., Hong Y. Fish stem cell cultures // Int. J. Biol. Sci. — 2011. — V. 7 (4). — P. 392–402.
70. Shikina S., Yoshizaki G. Improved in vitro culture conditions to enhance the survival, mitotic activity, and transplantability of rainbow trout type A spermatogonia // Biol. Reprod. — 2010. — V. 83. — P. 268–276.
71. Bejar J., Hong Y., Alvarez M. C. An ES-like cell line from the marine fish *sparus aurata*: characterization and chimaera production // Transgenic Res. — 2002. — V. 11. — P. 279–289.
72. Chen S. L., Ye H., Sha Q. et al. Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas // J. Fish. Biol. — 2003. — V. 63. — P. 10.
73. Chen S. L., Sha Z. X., Ye H. Q. et al. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*) // Mar. Biotechnol. — 2007. — V. 9. — P. 82–91.
74. Parameswaran V., Shukla R., Bhonde R. et al. Development of a pluripotent ES-like cell line from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) — an oviparous stem cell line mimicking viviparous es cells // Ibid. — 2007. — V. 9. — P. 766–775.
75. Holen E., Hamre K. Towards obtaining long term embryonic stem cell like cultures from a marine flatfish, *Scophthalmus maximus* // Fish. Physiol. Biochem. — 2004. — V. 29. — P. 245–252.
76. Holen E., Kausland A., Skjaerven K. Embryonic stem cells isolated from atlantic cod (*Gadus morhua*) and the developmental expression of a stage-specific transcription factor ac-pou2 // Ibid. — 2010. — V. 36 (4). — P. 1029–39.
77. Campbell K. H., McWhir J., Ritchie W. A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // Nature. — 1996. — V. 380. — P. 64–66.
78. Chen H., Yi Y., Chen M. et al. Studies on the developmental potentiality of cultured cell nuclei of fish // Int. J. Biol. Sci. — 2010. — V. 6. — P. 192–198.
79. Hong N., Li Z., Hong Y. Fish stem cultures // Ibid. — 2011. — V. 7 (40). — P. 392–402.
80. Patolsky F., Zheng G. F., Hayden O. et al. Electrical detection of single viruses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — V. 101. — P. 14017–14022.
81. Li Q. L., Mahendra, S., Lyon D. Y. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications // Water Res. — 2008. — V. 42. — P. 4591–4602.
82. Pradeep T., Anshup C. Noble metal nanoparticles for water purification: a critical review // Thin Solid Films. — 2009. — V. 517. — P. 6441–6478.
83. Рудь Ю. П., Прилуцька С. В., Бучацький Л. П. та ін. Застосування C<sub>60</sub>-фулеренів для фотодинамічної інактивації іридовірусів комарів. Опис до патенту на винахід. — 2012. — Бюл. №2. — 5.01.2012.
84. Rud Yu., Buchatsky L., Prilutskyy Yu. et al. Using C<sub>60</sub> fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent virus // J. Enz. Inhib. Med. Chem. — 2012. — V. 27 (4). — P. 614–617.
85. Бучацький Л. П., Стародуб Н. Ф., Ногарев А. В. Применение поверхностного плазмонного резонанса для экспресс-диагностики ретровирусных инфекций рыб / Тез. Всерос. конф. «Пробл. патол. иммунол. охр. здор. рыб и др. гидробионт.» — Борок, 2003. — С. 17–18.

86. *Buchatsky L. P., Starodub N. F.* Immune sensor based on surface plasmon resonance for express control of fish retroviral infection. Proc. of the 2-nd bilateral conf. «Aquatic and marine animal health». — Shepherdstown, 2003. — P. 15.
87. *Rubinsky B., Arav A., Fletcher G. L.* Hypothermic protection: a fundamental property of antifreeze proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1991. — V. 180. — P. 566–571.
88. *Tablin F., Oliver A. E., Walker N. J. et al.* Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation // *J. Cell Physiol.* — 1996. — V. 168. — P. 305–313.
89. *Low W. K., Miao M., Ewart K. V. et al.* Skin-type antifreeze protein from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: expression and characterization of 9,700 recombinant protein // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273. — P. 23098–23103.
90. *Hays L. M., Feeney R. E., Crowe L. M. et al.* Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — V. 93. — P. 6835–6840.

## БІОТЕХНОЛОГІЯ АКВАКУЛЬТУРИ РИБ

*Л. П. Буцацький*

Інститут рибного господарства УААН,  
Київ, Україна

*E-mail: irido1@bigmir.net*

Узагальнено останні досягнення біотехнології аквакультури риб та результати застосування сучасних методів досліджень для підвищення рибопродуктивності. Окрім прикладних аспектів, застосування сучасних методів біотехнології відкриває широкі можливості для проведення фундаментальних досліджень генетики статі, поліплоїдії, віддаленої гібридизації та біології розвитку кісткових риб. Наведено приклади застосування методів сучасної біотехнології для отримання трансгенних риб з посиленими темпами росту та сурогатних риб. Докладно розглянуто методи одержання одностатевих стад самок лососевих і осетрових з великою кількістю ікри, а також стерильних (триплоїдних) риб. Велику увагу приділено андрогенезу, особливо диспермному, у зв'язку з проблемою збереження рідкісних та зникаючих видів риб лише з генетичного матеріалу сперміїв. Подано приклади отримання віддалених гібридів за допомогою диспермного андрогенезу та алкілованої ДНК. Розглянуто методи одержання первинних статевих клітин риб, останні досягнення в культивуванні й використанні стовбурових клітин. Описано методи трансплантації оогоній і сперматогоній для одержання сурогатних риб. Наведено позитивні результати ксенотрансплантації сперматогоній, а також коротку характеристику кріопротекторних протеїнів риб та перспективи їх практичного використання.

**Ключові слова:** риби, підвищення темпів росту, репродукція, стерилізація, андрогенез, стовбурові клітини, трансплантація, антифризні протеїни.

## BIOTECHNOLOGY OF THE FISH AQUACULTURE

*L. P. Buchatsky*

Institute for Fisheries of Ukrainian Academy  
of Agrarian Sciences, Kyiv, Ukraine

*E-mail: irido1@bigmir.net*

The latest progress in biotechnology on fish aquaculture and different modern methods of investigations for increasing of fish productivity in aquaculture are analyzed. Except for the applied aspect, the use of modern biotechnological methods of investigations opens new possibilities for fundamental researches of sex-determining mechanisms, polyploidy, distant hybridization, and developmental biology of bony fishes. Review contains examples of utilizing modern biotechnology methods to obtain transgenic fishes with accelerated growth and for designing surrogate fishes. Methods for receiving unisexual shoals of salmon and sturgeon female fishes with the view of obtaining a large quantity of caviar, as well as receiving sterile (triploid) fishes are analyzed. Great attention is given to androgenesis, particularly to disperm one, in connection with the problem of conserving rare and vanishing fish species using only sperm genetic material. Examples how distant hybrids may be obtained with the use of disperm androgenesis and alkylated DNA are given. Methods of obtaining fish primordium germ cells, recent developments in cultivation of fish stem cells and their use in biotechnology, as well as ones of transplantation of oogonium and spermatogonium to obtain surrogate fishes. The examples of successful experiments on spermatogonial xenotransplantation and characteristic of antifreezing fish proteins and also the prospect of their practical usage are given.

**Key words:** fishes, grows acceleration, reproduction, sterilization, androgenesis, stem cells, transplantation, antifreeze proteins.