

Л. В. Козикова

«Суперлосось» и другие рыбы, устойчивые к холоду

Аннотация. В работе рассматриваются проблемы, связанные с устойчивостью рыб к низким температурам. Для получения животных, устойчивых к холоду, методы отбора и подбора холодоустойчивых организмов менее эффективны, по сравнению с трансгенными технологиями, позволяющими создавать генетически измененные организмы, устойчивые к холодным условиям обитания. Наиболее интересным генетически измененным объектом среди рыб является «Суперлосось», созданный в фирме AquaBounty Technologies. «Суперлосось» является политрансгенной рыбой, т.к. в его геноме интегрированы чужеродные гены гормона роста и антифризные гены. Только через 20 лет этот продукт был впервые в мире представлен на коммерческий рынок, т.к. он был одобрен проверочным комитетом по питанию и лекарствам FDA (United States Food and Drug Administration).

В настоящем исследовании была поставлена задача по выяснению степени влияния низких температур на развитие, морфологию эмбрионов и личинок тропической рыбки *Danio rerio* с учетом выживаемости. На стадии 16–64 клеток была проведена работа по обработке ранних эмбрионов низкой температурой (10°C) на протяжении двух часов. Через каждые сутки проводили анализ морфологии эмбрионов, личинок и учитывали их жизнеспособность. Оптимальной температурой обитания у этого вида рыб является 26–29°C. Уже через 24 часа культивирования наблюдали в экспериментальных группах и в контроле аномалии развития, причем степень их выраженности разная в разных группах. В контрольной группе выживаемость эмбрионов и личинок данео полосатого, имеющих нормальное развитие, достаточно высока и колеблется от 72% до 93% на протяжении недели.

Около 80% эмбрионов имели нормальную морфологию, а процент эмбрионов с аномальным развитием составлял 15% после двух часовой обработки бластоцист при температуре 10°C. Максимальную смертность (66%) наблюдали в течение первых суток развития. Процент личинок с нормальным развитием на протяжении 5–7 суток в среднем составил в среднем 10,0%, а с аномальной морфологией — 6,2%. Среди морфологических нарушений развития наиболее часто встречающимися аномалиями были деформация скелета и водянка перикардальной области. Таким образом, в популяции тропических рыбок могут присутствовать особи, способные адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды. Представленная работа может быть применена при изучении и получении стрессоустойчивых форм рыб.

Ключевые слова: суперлосось, антифризные белки, рыбка *Danio rerio*, генетические конструкции, трансгенные рыбы, эмбрионы, жизнеспособность, морфология.

Авторы:

Козикова Лариса Васильевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55 а; e-mail: afyakov@mail.ru.

Введение. Проблема устойчивости рыб к низким температурам недостаточно изучена. Некоторые виды рыб адаптируются к максимально низким температурам. Известно, что антифризные белки синтезируются в печени и далее циркулируют в крови. Как правило, эти виды белков присутствуют у арктических видов животных. Сайка и нототения могут обитать при температуре, близкой к замерзанию воды. Из сыворотки антарктических рыб были выделены гликопротеиды, играющие роль своеобразных антифризов, защищающих живые организмы от замерзания. Эти белки свя-

зываются с кристаллами льда и препятствуют росту кристаллов льда. Известны и другие виды рыб, например, караси, выдерживающие даже температуру 0°C, зарываясь в ил, и продолжающие свою жизнедеятельность. Но для большинства даже холодоустойчивых рыб резкое понижение температуры приводит к гибели. Многие виды арктических рыб живут при низком содержании кислорода в воде. У антарктической белокровки нет гемоглобина и эритроцитов, а содержание железа очень низкое (меньше чем в 25 раз, чем у других видов). Бесцветная плазма доставляет орга-

нам недостаточное количество кислорода и у этого вида выработался дополнительный механизм компенсации за счет диффузии кислорода через кожу и увеличения интенсивности кровообращения (их сердце в 3 раза больше, чем у одинаковых по размерам других арктических видов рыб). Как же выживают рыбы в арктических водах? Известно, что точка замерзания плазмы у мелководной трески и бычка изменяется в диапазоне от $-0,77$ до $-0,88$ при температуре окружающей среды от $+4$ до $+7$. К зиме осмотическое давление плазмы у этих видов рыб увеличивалось вдвое преимущественно за счет хлоридов, что очевидно повышает адаптацию клеток организма к изменениям окружающей среды.

Для получения животных, устойчивых к холоду, методы отбора и подбора холодоустойчивых организмов не очень эффективны, тогда как трансгенные технологии позволяют создавать генетически измененные организмы, устойчивые к холодным условиям [1]. Атлантический лосось и другие виды лососей не имеют в своем геноме антифризные белки. Известны несколько методов, когда в оплодотворенные яйцеклетки вводили антифризные гены с собственным промотором [2, 3]. Так был создан трансгенный лосось, но уровень экспрессии гена был вначале не очень высокий [4, 5], хотя у трансгенных золотых рыбок с таким же геном экспрессия была выражена более эффективно [6]. В 1992 году был получен патент на создание трансгенных рыб, в которых промотор служил тканеспецифичный химерный антифризный ген, слитый с желаемой последовательностью [7].

Наиболее интересным генетически измененным объектом среди рыб несомненно является «*Суперлосось*», созданный в фирме *AquaBounty Technologies*.

Для достижения размеров «*суперлосося*» диким лососям необходимо более трех лет развития. Следует отметить, что этот продукт был впервые



Рис. 1. На дальнем плане «суперлосось» *AquaAdvantage* в возрасте 18–24 месяцев и весом 3 кг; на переднем плане дикий тип лосося того же возраста

в мире представлен на коммерческий рынок, т.к. он был одобрен проверочным комитетом по питанию и лекарствам *FDA* (United States Food and Drug Administration) [8]. Следует отметить, что проверочному комитету *FDA* потребовалось двадцать лет для проверки полученного продукта, и только в 2015 году было получено разрешение на продажу «*суперлосося*» вначале в США, а через год и в Канаде [9]. Этот объект был получен от разных доноров. Одним из доноров был тихоокеанский лосось с геном гормона роста, за счет которого скорость роста рыбы значительно увеличивалась по сравнению с дикими особями. Другим донором была угольная рыба с антифризным геном, что позволило разводить эти трансгенные особи в более холодных странах, таких как Канада. Гены были выделены, проклонированы и в составе генетической конструкции были введены в оплодотворенные клетки атлантического лосося. После интеграции чужеродных генов с целью получения только самок вместо оплодотворения провели гиногенез (один из видов партеногенетического развития). Часто создают трансгенные триплоидные особи, которые будучи стерильными, не смогут спариваться с особями дикого типа. Таким образом, были получены генетически измененные рыбы с новым обменом веществ, позволяющим быстро расти не только летом, но разводится и в течение всего года в различных климатических условиях.

Целью данного исследования явилось выяснение влияния низких температур на развитие, морфологию эмбрионов и личинок тропической рыбы *Danio rerio* с учетом выживаемости.

Материал и методы исследований. Взрослые особи полосатого данио были помещены в нерестовый 15-литровый аквариум (солёность воды 1 г/л NaCl, добавлены кондиционер и очиститель, $t=29^{\circ}\text{C}$, режим освещения 13 часов день, 11 часов ночь) внутри сетчатой камеры во избежание поедания эмбрионов производителями в соотношении самцов к самкам 2:3. На следующий день производители были извлечены в общий аквариум, а эмбрионы собраны при помощи сифона. Культивирование эмбрионов проводилось в нерестовом аквариуме в тех же условиях с регулярным контролем стадии развития [10]. Анализ стадий развития и морфологических изменений рыб проводили под микроскопом. На стадии 16–64 клеток была проведена работа по обработке ранних эмбрионов низкой температурой (10°C) на протяжении двух часов. Через каждые сутки проводили анализ морфологии эмбрионов, предличинок, личинок и учитывали их жизнеспособность, как процентное отношение мертвых и живых эмбрионов.

Статистическая обработка материалов проводилась при использовании пакета программ *Excel-10* for Windows.

Результаты исследований и их обсуждение.

Danio rerio является уникальным объектом среди рыб, т.к. очень хорошо изучен его геном, что отражено на его информационном портале (*Zebrafish Information Network*, <http://zfin.org/>). Кроме того, благодаря работам Киммела [11] подробно изучены стадии и время эмбрионального развития. Как и у многих видов рыб у полосатого данио достаточно быстро протекают стадии раннего эмбрионального развития, занимая всего 2,5 часа развития от зиготы до бластоцисты. Для того, чтобы определить степень толерантности организма рыб к неблагоприятным факторам среды, необходимо знать, что оптимальной температурой обитания у этого вида рыб является 26–29°C. При изучении морфологии ранних эмбрионов было выявлено, что уже через 24 часа культивирования наблюдали в экспериментальных группах и в контроле аномалии развития, причем степень их выраженности разная в разных группах. Результаты выживаемости и морфологии в контроль-

ной группе (без воздействия холода) на протяжении недели приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы, выживаемость эмбрионов и личинок данио полосатого, имеющих нормальное развитие, достаточно высока и колеблется от 72% до 93% на протяжении недели. Пик гибели наступает к 24 часам развития, что тесно взаимосвязано с наибольшим процентом аномально развитых бластоцист к этому времени. Количество нормально развивающихся эмбрионов и личинок достаточно высоко и после критической точки изменяется незначительно. Показано сокращение численности аномально развивающихся эмбрионов к моменту вылупления (48 часов после оплодотворения) и к 5-суточному возрасту ступенчато почти вдвое, в дальнейшем изменения незначительны.

Что же происходит с развитием тропических рыбок при длительном охлаждении? На протяжении двух часов эмбрионы *Danio rerio* были помещены в холодную воду при температуре 10°C. Полученные данные представлены в таблице 2.

Около 80% эмбрионов имели нормальную морфологию после помещения их в холодную воду на два часа, при этом процент гибели был невысоким,

Таблица 1. Раннее эмбриональное развитие *Danio rerio* на бластоцисто-личиночной стадии (контрольная группа)

Время развития	Нормальное развитие			Аномальное развитие			Гибель		
	n	M±m	%	n	M±m	%	n	M±m	%
2–3 часа	432	108,0±0,97	93,1	28	7,0±0,22	6,0	4	1,0±0,29	0,9
24 часа	335	83,8±3,17	72,2	52	13,0±0,95	11,2	73	18,2±0,97	15,7
48 часа	343	85,8±3,28	73,9	27	6,7±1,08	5,8	17	14,3±0,78	3,7
5 суток	340	85,0±3,39	73,3	11	2,7±0,75	2,3	19	14,8±1,57	4,1
6 суток	340	85,0±3,39	73,3	10	2,5±0,66	2,2	1	0,25±0,50	0,2
7 суток	340	85,0±3,39	73,3	10	2,5±0,66	2,2	0	0	0

Таблица 2. Развитие эмбрионов *Danio rerio* от стадии бластоциста до личиночной стадии после 120 минут обработки холодной водой при температуре 10°C

Сроки развития	Нормальное развитие			Аномальное развитие			Гибель		
	n	M±m	%	n	M±m	%	n	M±m	%
2–3 часа	166	83,0±3,40	79,4***	32	16,0±2,00	15,3***	11	5,5±2,34	5,3***
24 часа	32	16,0±1,00	15,3***	35	17,5±2,03	16,7*	131	65,5±5,37	62,7***
48 часа	27	13,5±2,58	12,9***	17	8,5±0,51	8,1	23	11,5±1,03	11,0***
5 суток	20	10,0±2,53	9,6***	15	7,5±0,55	7,2***	9	4,5±0,71	4,3
6 суток	21	10,5±2,31	10,0***	13	6,5±0,59	6,2***	1	0,5±0,71	0,5
7 суток	22	11,0±2,11	10,5***	11	5,5±0,63	5,3**	1	0,5±0,71	0,5

* P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001 по сравнению с контрольной группой.

а процент эмбрионов с аномальным развитием составлял уже 15%. Критическим периодом развития и максимальной смерти эмбрионов были 24 часа эмбрионального развития (66%). На момент вылупления (48 часов после оплодотворения) наблюдается сокращение численности аномально развивающихся бластоцист почти вдвое. Процент личинок с нормальным развитием на протяжении 5–7 суток составил в среднем 10,0%, а с аномальной морфологией — 6,2%. Наиболее часто встречающиеся аномалии развития связаны с деформацией скелета, что подтверждается в ряде других работ [12]. Лордозы встречались в средней части скелета и в хвостовой области. Другой распространенной аномалией была водянка перикардальной области, очевидно вызванная нарушением осмотического давления.

Полученные данные указывают, что в популяции тропических рыбок могут присутствовать особи, способные адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды. Впервые показано, что обработка эмбрионов на стадии бластоцисты при 10°C приводит к достоверному ($P \leq 0,001$) уменьшению количества эмбрионов с нормальной морфологией и увеличению количества аномальных форм развития, что в конечном итоге заканчивается значительной гибелью по сравнению с контрольной группой. Представленная работа может быть применена при изучении стрессоустойчивости ранних эмбрионов, а также возможности удлинить периоды зиготы и стадии 2-х бластомеров с целью введения генов и других агентов на самых ранних стадиях развития.

Настоящая работа была проведена в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № ГЗ АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году.

Литература

1. Volckaert F. Transgenic fish. The future of fish with novel genes / F. Volckaert, F. Ollevie // The Fund for Scientific Research (FWO Vlaanderen). — 1996. — P. 58.
2. Козикова Л. В. Трансгенные животные. СПб. Изд-во Проспект Науки. 2017. 224 с.
3. Devlin R. H. Growth of domesticated transgenic fish / R. H. Devlin, C. A. Biagi, T. Y. Yesaki, D. E. Smailus, J. C. Byatt // Nature. — 2001. — V. 409. — P. 781–782.
4. Fletcher G. L. Transgenic fish for aquaculture / G. L. Fletcher, P. L. Davies // Genetic Engineering. — 1991. — V. 13. — P. 31–339.
5. Fletcher G. L. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, P. L. Davies & C. L. Hew // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1988. — 45. — P. 352–357.
6. Wang R. Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaption / R. Wang, Z. Cong, C. L. Hew // Mol. Mar. Biol. Biotech. — 1995. — V. 4. — P. 20–26.
7. Choy L. Hew, Garth L. Fletcher. Patent. Gene construct for production of transgenic fish. WO 1992016618 A1. Номер заявки PCT/CA192/000109. Дата публикации 1 окт. 1992.
8. Blumenthal, Les «Company says FDA is nearing decision on genetically engineered Atlantic salmon». The Washington Post. Retrieved 2 August 2010.
9. Dennis, Brady «FDA bans imports of genetically engineered salmon — for now». Washington Post. Retrieved 9 April 2016.
10. Козикова Л. В. Морфоцитогенетический мониторинг эмбриональных клеток *Danio rerio* / Козикова Л. В., Лохматова С. А. // Цитология. — 2007. — Т. 49. — № 9. — С. 757–758.
11. Kimmel C. B. Stages of embryonic development of the zebrafish / C. B. Kimmel et al. // Dev Dyn. — 1995. — V. 203 (3). — P. 253–310.
12. Koumoundouros G. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase / G. Koumoundouros, M. Pavlidis, L. Anezaki, C. Kokkari, A. Sterioti, P. Divanach, M. Kentouri // J. Exp. Zool. — 2002. — V. 292 (6). — P. 573–739.

Kozikova L. V.

«Supersalmon» and other fish that are resistant to cold

Abstract. *The paper deals of the problems associated with the resistance of fish to low temperatures. Methods of selection of cold-resistant organisms are less effective than transgenic technologies that allow the creation of genetically modified organisms that are resistant to cold habitats. The most interesting genetically modified object among fish is «Supersalmon», created in the firm AquaBounty Technologies. «Supersalmon» is a polytransgenic fish, because in its genome contains integrated foreign growth hormone genes and antifreeze genes. Only 20 years later this product was first introduced in the world to the commercial market, since it was approved by the screening committee of the Food and Drug Administration of the United States (FDA).*

*The aim of this study was to determine the degree of influence of low temperatures on the development, morphology of embryos and larvae of tropical fish *Danio rerio* with regard to the survival. At the stage 16–64 cells, embryos were placed in cold water (10°C) for two hours. Every day, the morphology of the embryos and larvae was analyzed and their viability was taken into account. The optimum temperature for this fish species is 26–29°C. After 24 hours of cultivation, the developmental anomalies were observed in the experimental groups and in control, but their degree of expression was different in different groups. In the control group the survival rate of zebrafish embryos and larvae with normal development varies from 72% to 93% for the week.*

About 80% of the embryos had normal morphology, and the percentage of embryos with abnormal development was 15% after two hours of blastocyst treatment at a temperature of 10°C. 24 hours of development was a critical period with a maximum embryo death rate of 66%. The percentage of larvae with normal development for 5–7 days averaged an average of 10.0%, and with an abnormal morphology — 6.2%. The most common anomalies are deformation of the skeleton and dropsy. Thus, in the population of tropical fish there may be individuals able to adapt to extreme environmental conditions. The presented work can be applied in studying and obtaining stress-resistant forms of fish.

Keywords: «Supersalmon», antifreeze proteins, fish *Danio rerio*, genetic constructs, transgenic fish, embryos, vitality, morphology.

Authors:

Kozikova Larisa Vasil'evna. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics, Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry, St. Petersburg, p.Tjarlevo, Moskovskoe shosse, 55a; 196601; e-mail: larkozik@list.ru.

References

1. Volckaert F. Transgenic fish. The future of fish with novel genes / F. Volckaert, F. Ollevie // The Fund for Scientific Research (FWO Vlaanderen). — 1996. — P. 58.
2. Kozikova L.V. Transgenic animals. St. Petersburg. Prospect of Science. 2017. 224 p.
3. Devlin R. H. Growth of domesticated transgenic fish / R. H. Devlin, C. A. Biagi, T. Y. Yesaki, D. E. Smalilus, J. C. Byatt // Nature. — 2001. — V. 409. — P. 781–782.
4. Fletcher G. L. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, P. L. Davies & C. L. Hew // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1988. — 45. — P. 352–357.
5. Fletcher G. L. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, P. L. Davies & C. L. Hew // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1988. — 45. — P. 352–357.
6. Wang R. Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaption / R. Wang, Z. Cong, C. L. Hew // Mol. Mar. Biol. Biotech. — 1995. — V. 4. — P. 20–26.
7. Choy L. Hew, Garth L. Fletcher. Patent. Gene construct for production of transgenic fish. WO 1992016618 A1. № PCT/CA192/000109. Date: 1. oct. 1992.
8. Blumenthal, Les «Company says FDA is nearing decision on genetically engineered Atlantic salmon». The Washington Post. Retrieved 2 August 2010.
9. Dennis, Brady «FDA bans imports of genetically engineered salmon — for now». Washington Post. Retrieved 9 April 2016.
10. Kozikova L. V. Morphocytogenetic monitoring of embryonic cells. *Danio rerio* / L. V. Kozikova, S. A. Lokhmatova // Cytology. — 2007. — T. 49. — № 9. — P. 757–758
11. Kimmel C. B. Stages of embryonic development of the zebrafish / C. B. Kimmel et al. // Dev Dyn. — 1995. — V. 203 (3). — P. 253–310.
12. Koumoundouros G. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase / G. Koumoundouros, M. Pavlidis, L. Anezaki, C. Kokkari, A. Sterioti, P. Divanach, M. Kentouri // J. Exp. Zool. — 2002. — V. 292 (6). — P. 573–739.