

УДК 639.3 041.2: 639.3.03: 639. 371.13

## ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОРЕЛИ ИЗ 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ ОТ САМЦА, ОБРАБОТАННОГО МЕТИЛТЕСТОСТЕРОНОМ

*К.В. Метальникова (ВНИРО)*

Основная цель федеральной программы «Аквакультура России в период до 2005 года» — последовательное увеличение выпуска продукции аквакультуры. Одно из приоритетных направлений — «Совершенствование методов искусственного воспроизводства...», в связи с чем направленное воздействие на формирование у рыб желаемого пола относится к таким методам. Схема получения преимущественно самок широко известна: на первом этапе получают небольшое количество реверсантов с использованием аналогов тестостерона из обычной молоди, на втором этапе полученных реверсантов скрещивают с обычными самцами и получают преимущественно самок, которых выращивают до созревания. В США патент N5480774 от 2 января 1996 г. дает возможность идентифицировать самцов лососевых рыб на ранних этапах жизненного цикла по псевдогену GN-Y, половому детерминированному локусу на Y хромосоме у самцов, рекомендованному для определения пола в качестве маркера у лососевых рыб. Отсутствие такого локуса у реверсантов позволит определить их как самок. Метод рекомендуется авторами к использованию в Объединенном Королевстве, где производство реверсантов лососевых видов рыбы поставлено на промышленную основу с 1979 г. [Choy L. Hew, Shao J. Du, 1998].

Метод получения интерсексов был запатентован в Абердинском университете как метод ауто-иммунной кастрации в 1986 г. [Bye V.J. et. al., 1986].

В 1998 г. на заседании ICES в городе Хельсинки была создана Головная рабочая группа по координации получения интерсексов на биологических объектах аквакультуры. Одним из основных партнеров по тематике, определенной как «P4501A induction and imposex / intersex measurement», была названа FRS Морская лаборатория, Абердин. Программа создавалась для координации действий по каждой партнерской программе с применением ее через инфраструктуру, составляющую Центральную группу управления и Экспертную лабораторию [ICES, 1999].

У нас в стране метод получения интерсексов и реверсантов разрабатывался с 1978 г. на лососевых рыбах [Метальникова, 1992]. В отличие от общепринятой практики использования интерсексов для получения однополого потомства из самок, мы [Метальникова, 1991, 1992; Метальникова, Голубев, 2000] отбираем реверсантов — рыб с вполне сформировавшимися гонадами, густо пронизанными кровеносными сосудами, за счет чего увеличивается оплодотворяющая способность спермы реверсантов. При этом реверсантов из самок можно использовать несколько нерестовых сезонов. Для ранней идентификации реверсантов нами используется гистологический метод изучения гонад [Метальникова, 1989, 1992, 1999]. Организацией, например, 1–2-х репродукторов по воспроизводству приоритетных видов рыбы с использованием этого метода можно значительно интенсифицировать воспроизводство лососевых рыб, а разработка ана-

логичных методов воспроизводства для осетровых рыб, угрей, сигов и других позволит расширить и интенсифицировать рыбоводство [Fish Farm International, 2000], поставить на промышленную основу товарное производство самок объектов аквакультуры и восстановить утраченные популяции редких и исчезающих видов рыбы.

При формировании стада из рыб желаемого пола во 2-м поколении после использования аналогов тестостерона в 1-м поколении никакого вмешательства в геном самок не происходит [Choy L. Hew et. al., 1998], по качеству потомство от реверсантов из самок соответствует потомству от обычных производителей форели [Jonstone et. al., 1979; Okada et. al., 1979, 1982]. Адаптивная реакция организма самок под влиянием внешних факторов позволяет получать рыб желаемого пола с небольшими материальными затратами [Метальникова, 1996].

На состоявшейся в сентябре 2000 г. 20-й конференции Европейского общества для сравнительной эндокринологии в Португалии, в Фаро, был заявлен и представлен доклад по имеющейся в нашей стране методике получения реверсантов лососевых рыб. Был выставлен доказательный иллюстративный материал с полученными результатами. Материалы опубликованы в сборнике 20<sup>th</sup> Conference of European Comparative Endocrinologists, 5–9 september 2000, Faro, Portugal [Metalnikova, 2000].

Ранее нами исследованы дозы метилтестостерона и тестостерон-пропионата в 1, 3, 6, 16 мг гормона на 1 кг корма. Аналоги тестостерона добавляли в корм стальноголового лосося и форели с перехода молоди на внешнее питание в разных климатических областях России: от субтропиков до заполярья [Метальникова, 1989, 1990а,б, 1992, 1999, 2000 а,б; публикаций по теме более 20]. Условия содержания рыбы были оптимальными во всех экспериментах. Контрольные рыбы получали комбикорм без добавления аналогов тестостерона. В работе использовали морфометрические [Правдин, 1966], физиологические [Строганов, 1962], рыбоводные [Жанидьев, Гамыгин, 1985], гистологические [Ромейс, 1953; Паушева, 1988], статистические [Рокицкий, 1961; Урбах, 1961] методы исследования, проанализированы несколько тысяч рыб, проведено несколько десятков тысяч измерений.

В ходе работы выявили общие закономерные изменения в формировании вторичных половых признаков у лососевых рыб при воздействии аналогами тестостерона. В первую очередь это относится к динамике формирования реверсантов через «интерсексуальную стадию развития» [Метальникова, 1999]: из 100% экспериментальных рыб с соотношением полов 1:1 получается среди самок до 98% реверсантов при оптимальных условиях проведения работы, как это было на нерестово-выростном хозяйстве «Прибрежное» в 1996 г. При менее оптимальных условиях в период обработки будущих реверсантов аналогами тестостерона получают не менее 3% реверсантов из самок [Метальникова, Бурцев и др., 1989]. У экспериментальных рыб были выше, чем у контрольных, темп роста (рис. 1) и интенсивность потребления кислорода при одинаковой температуре воды. Причем эти феномены выявлялись в разных климатических зонах у экспериментальных лососей (рис. 2), что объясняется анаболическим характером воздействия андрогенов [Метальникова, 1987, 1992].

От стальноголовых лососей в условиях субтропической зоны Северного Кавказа и от форели в условиях приморского климата (Прибалтика) дважды получено потомство от реверсантов из самок, частично — от одних и тех же реверсантов (табл. 1).

В Прибалтике потомство реверсантов вырастили до наступления половой зрелости, выявив определенные закономерные изменения, связанные с наследованием массы и длины тела у самок — потомства реверсантов лососевых рыб. На рис. 3–5 приведены показатели выхода самок в потомстве от 3-х реверсантов в Прибалтике, темпов роста и выживания потомства по сравнению с контролем: чем больше в потомстве было самок, тем выше были все показатели. Аналогичные результаты наблюдали у потомства реверсантов стальноголового лосося в субтропиках на Северном Кавказе [Метальникова, 1990]. Нашли высокодоверные корреляционные связи между массой и длиной тела у потомства реверсантов и родительского поколения в одном возрасте, у форели в Приморье и у

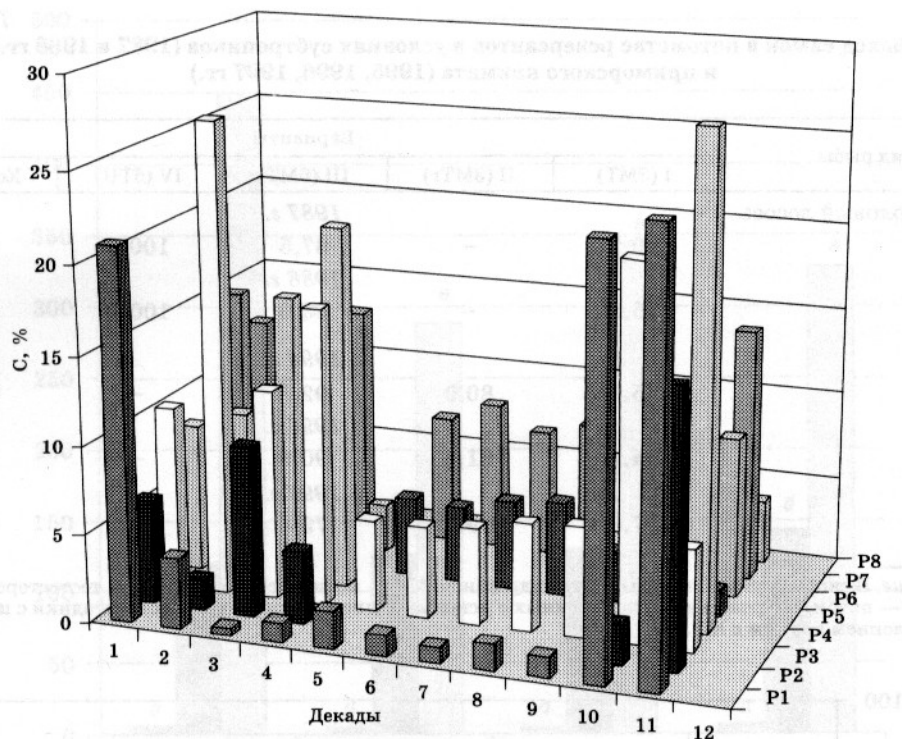


Рис. 1. Удельная скорость роста:  $C = [(\ln W_2 - \ln W_1) / 0,4343(T_2 - T_1)] \cdot 100\%$

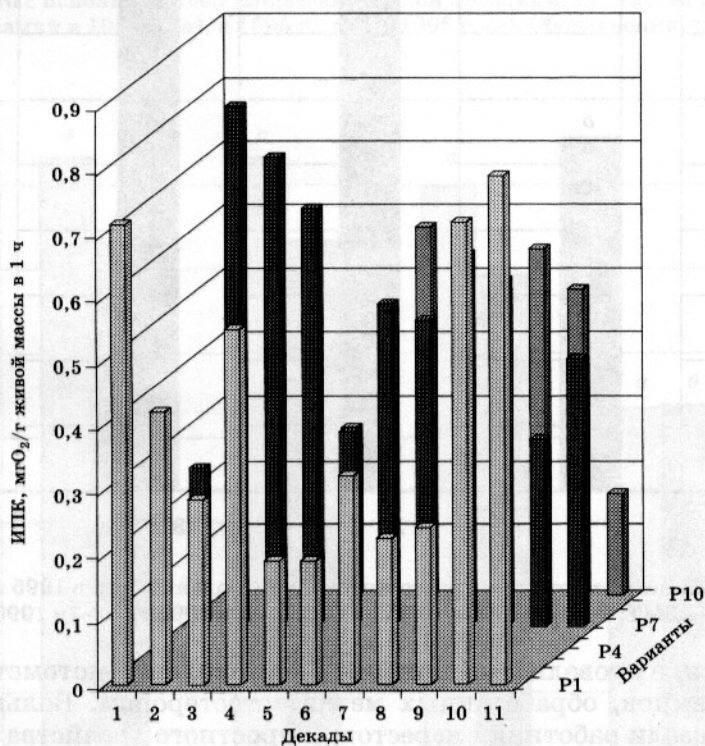


Рис. 2. Интенсивность потребления кислорода,  $\text{mgO}_2/\text{г}$  живой массы в 1 ч

стальноголового лосося в субтропиках ( $r = (0,88) - (+0,71)$  и  $r = (-0,78) - (-0,75)$  соответственно при  $p < 0,05$ ) [Метальникова, 1990; Метальникова, Голубев, 2000]. По-видимому, длина и масса тела у лососевых передаются по наследству индивидуально и зависят от производителей. В данном случае скрещивали самок.

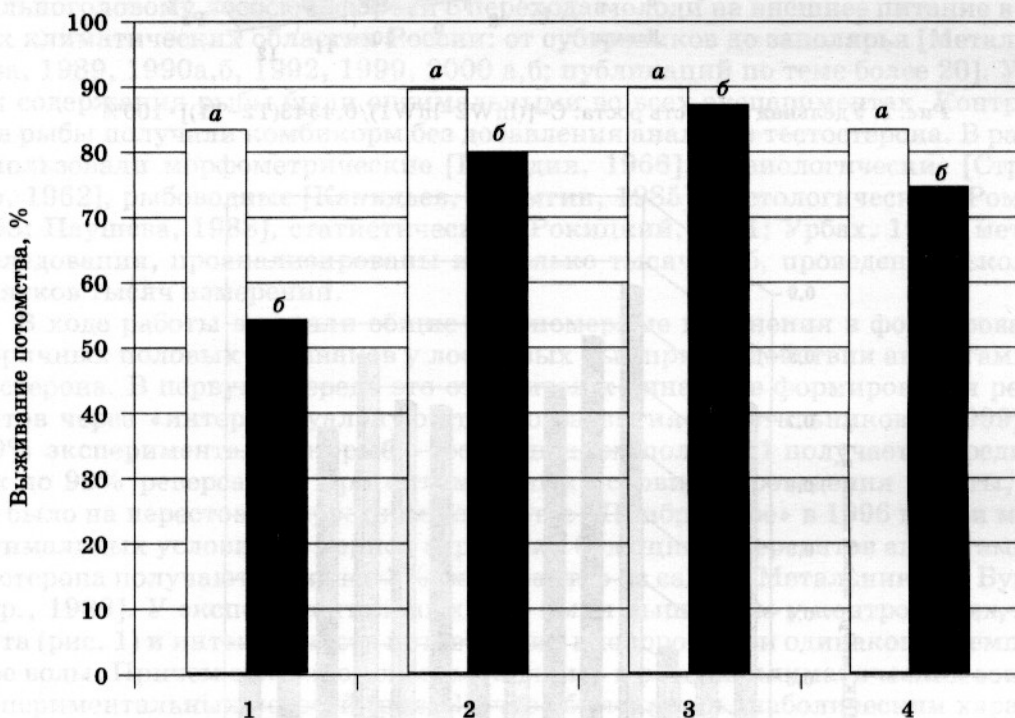


Таблица 1

**Выход самок в потомстве реверсантов в условиях субтропиков (1987 и 1988 гг.)  
и приморского климата (1995, 1996, 1997 гг.)**

Вид рыбы	Варианты				
	I (ЗМТ)	II (ЗМТг)	III (6МТ)	IV (6ТП)	Контроль
Стальноголовый лосось	1987 г.				
	90,7	—	87,5	100,0	52,0
Форель	1988 г.				
	96,5	—	83,0	100,0	48,0
Форель	1994 г.				
	75,0	80,0	92,8	—	61,5
	1995 г.				
Форель	1995 г.				
	64,1	61,6	90,9	—	53,8
Форель	1997 г.				
	67,6	69,7	73,4	—	53,8

*Примечание.* В скобках указаны дозы и вид андрогенов: МТ — метилтестостерон; ТП — тестостерон-пропионат; ЗМТг — потомство реверсантов, полученных с использованием гиногенетической методики с последующим кормлением кормом с МТ.



**Рис. 3.** Выживание потомства реверсантов и контрольных рыб в 1995 и 1996 гг.:  
1 — ЗМТ; 2 — ЗМТг; 3 — 6МТ; 4 — К; а — в 1995 г.; б — в 1996 г.

В Прибалтике провели скрещивание 2-го поколения потомства реверсантов и потомства самцов, обработанных метилтестостероном. Большую помощь в этой работе оказали работники нерестово-выростного хозяйства «Прибрежное» и студенты КГТУ (г. Калининград). Рассмотрим результаты исследования 2-го поколения потомства одного самца, обработанного метилтестостероном, полученного в 1996 г. на нерестово-выростном хозяйстве «Прибрежное».

**Материал и методика.** Первое поколение потомства одного самца, обработанного метилтестостероном (реверсанта из самца), рассортировали на элитную форель (Э) и кондиционную (К). К элитной группе форели относились особи с наиболее высокими на момент сортировки экстерьерными показателями:  $L_c = 18,2 + 3,1$  см и  $P = 46,3 + 4,1$  г, имеющие высокую подвижность при

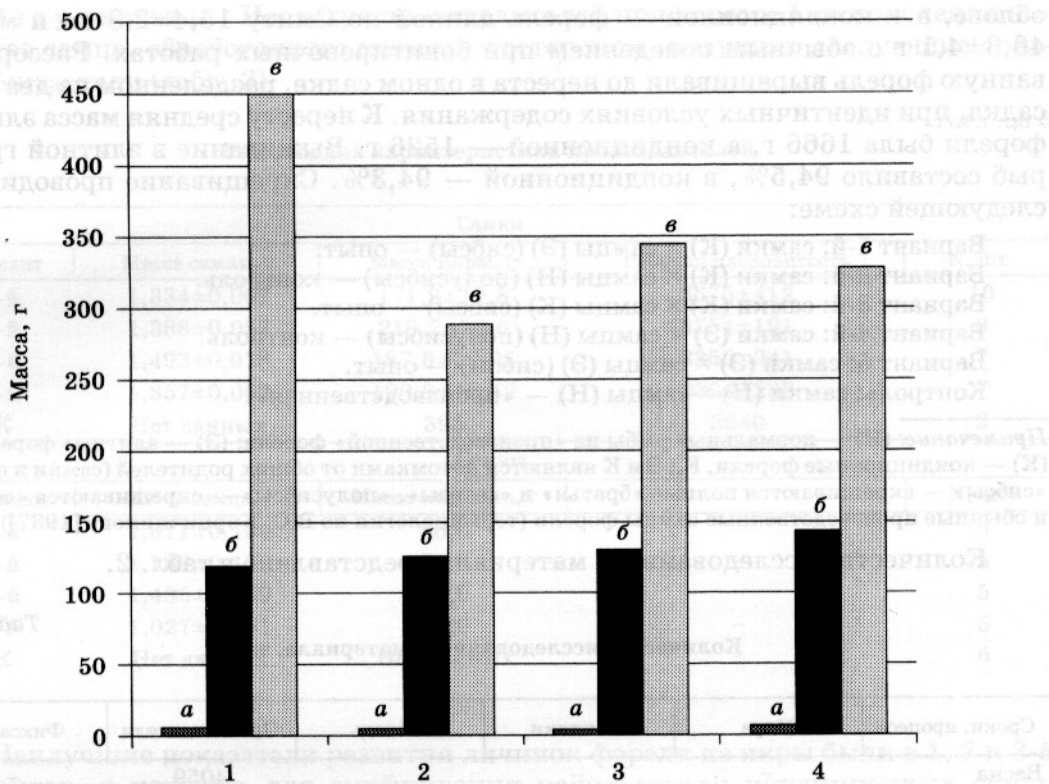


Рис. 4. Прирост массы потомства форели обыкновенной, потомства реверсанта, полученного с использованием гиногенетической методики, потомства реверсанта от обычной самки в 1994 г. (а), в 1995 г. (б) и в 1996 г. (в). Обозначения, как на рис. 3

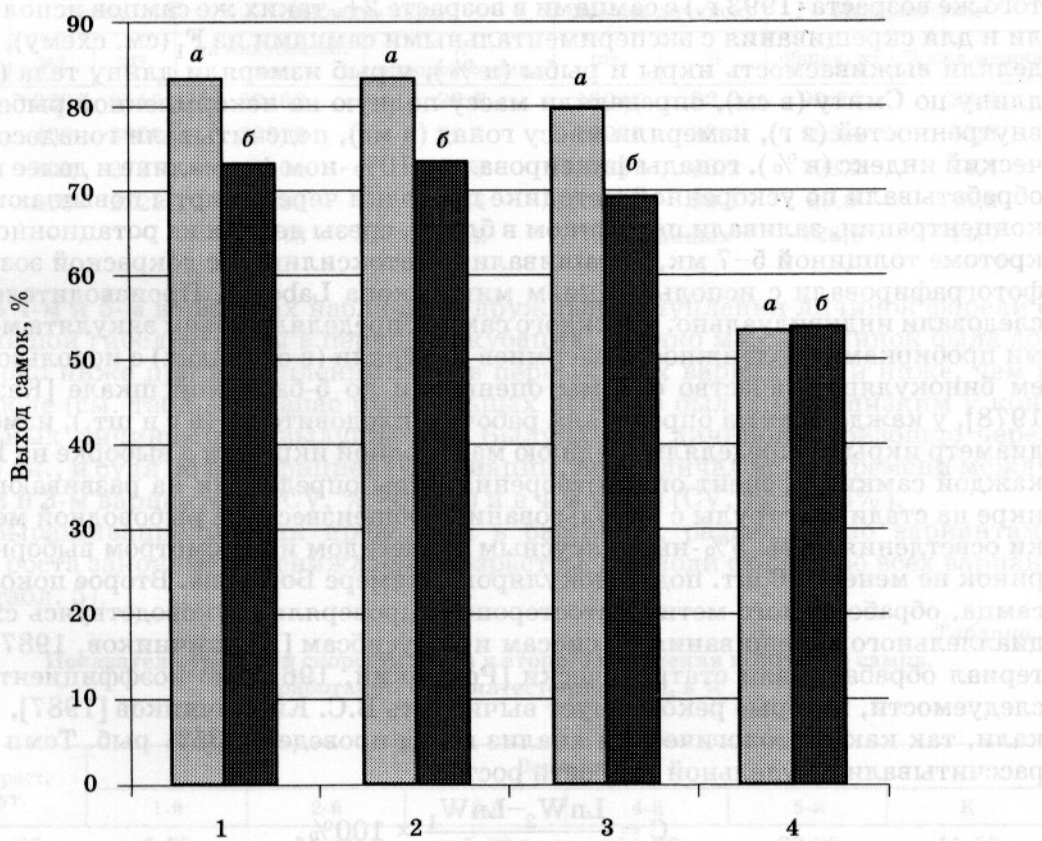


Рис. 5. Выход самок в потомстве в 1995 г. (а) и в 1997 г. (б). Обозначения, как на рис. 3

облове, а к кондиционной — форель длиной по Смиту  $15,4 \pm 2,8$  см и массой  $46,3 \pm 4,1$  г с обычным поведением при бонитировочных работах. Рассортированную форель выращивали до нереста в одном садке, разделенном на два полусадка, при идентичных условиях содержания. К нересту средняя масса элитной форели была 1666 г, а кондиционной — 1526 г. Выживание в элитной группе рыб составило 94,5%, в кондиционной — 94,3%. Скрещивание проводили по следующей схеме:

- Вариант 1-й: самки (К) × самцы (Э) (сисбы) — опыт.
- Вариант 2-й: самки (К) × самцы (Н) (полусисбы) — контроль.
- Вариант 3-й: самки (К) × самцы (К) (сисбы) — опыт.
- Вариант 4-й: самки (Э) × самцы (Н) (полусисбы) — контроль.
- Вариант 5: самки (Э) × самцы (Э) (сисбы) — опыт.
- Контроль: самки (Н) × самцы (Н) — «производственная».

*Примечание:* (Н) — нормальные рыбы из «производственной» форели; (Э) — элитные форели,  $F_1$ ; (К) — кондиционные форели,  $F_2$ ; Э и К являются потомками от общих родителей (самки и самца); «сисбы» — скрещиваются полные «братья» и «сестры», «полусисбы» — скрещиваются «сестры» и обычные производственные самцы форели (терминология по В.С. Кирпичникову [1987]).

Количество исследованного материала представлено в табл. 2.

Таблица 2

Количество исследованного материала, экз.

Сроки, процесс	Икра	Личинки	Молодь	Производители	Фиксация
Весна	—	—	—	4059	—
Нерест	8371	—	—	80	34
Инкубация	1256	119	217	—	217

Для сравнения использовали потомство, полученное от скрещивания самок того же возраста (1993 г.) с самцами в возрасте 2+, таких же самцов использовали и для скрещивания с экспериментальными самками из  $F_1$  (см. схему). Определяли выживаемость икры и рыбы (в %), у рыб измеряли длину тела (в см), длину по Смиту (в см), определяли массу полную на некормленной рыбе и без внутренностей (в г), измеряли массу гонад (в мг), подсчитывали гонадосоматический индекс (в %), гонады фиксировали в 10%-ном формалине и далее пробы обрабатывали по ускоренной методике проводки через спирты повышающейся концентрации, заливали парафином в блоки, срезы делали на ротационном микротоме толщиной 5–7 мк, окрашивали гематоксилином с докраской эозином, фотографировали с использованием микроскопа Laboval. Производителей исследовали индивидуально, у каждого самца определяли объем эякулята мерными пробирками, подвижность спермиев измеряли (в секундах) с использованием бинокуляра, качество спермы оценивали по 5-балльной шкале [Казаков, 1978], у каждой самки определяли рабочую плодовитость (в г и шт.), измеряли диаметр икры и определяли среднюю массу одной икринки в выборке из 10 г от каждой самки. Процент оплодотворения икры определяли на развивающейся икре на стадии гастролы с использованием общеизвестной рыболовной методики осветления икры 5%-ным уксусным альдегидом и просмотром выборки икринок не менее 100 шт. под бинокуляром в камере Богорова. Второе поколение самца, обработанного метилтестостероном, проверяли, руководствуясь схемой диаллельного скрещивания по сиссам и полусиссам [Кирпичников, 1987]. Материал обрабатывали статистически [Рокицкий, 1961], но коэффициенты наследуемости, которые рекомендует вычислять В.С. Кирпичников [1987], не искали, так как гистологический анализ гонад проведен у 35% рыб. Темп роста рассчитывали по удельной скорости роста:

$$C = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{0,4343(T_2 - T_1)} \times 100\%,$$

где  $W$  — показатели исследуемого признака в период  $T$ ; 0,4343 — коэффициент перевода натуральных логарифмов [Чугунова, 1957].



Результаты. Исследуя производителей при нересте 1-го поколения потомства самца, обработанного метилтестостероном, получили следующие средние показатели (табл. 3).

Таблица 3

Рыбоводная характеристика производителей

Самки				
Вариант	Масса самки, г	Масса икры, г	Рабочая плодовитость	N, шт.
1-й	1,334±0,007	171,9±19,8	3675±412	10
2-й	1,388±0,057	210,2±10,6	3754±191	9
3-й	1,493±0,078	187,6±19,01	3350±341	7
4-й	1,857±0,062	190,8±16,47	3394±283	7
К	Нет данных	395	3640	3
Самцы				
Вариант	Масса самца, г	Масса эякулята, г		N, шт.
1-й	1,611±0,109	56,0	—	5
2-й	1,189±0,179	71,0	—	5
3-й	1,435±0,059	57,0	—	5
4-й	1,027±0,061	64,0	—	5
К	Нет данных	Нет данных	—	6

Наилучшие показатели развития личинок форели из икры были в 1, 2 и 3-й вариантах, в которых для скрещивания использовали кондиционных самок (см. схему и табл. 4).

Таблица 4

Результаты развития икры экспериментальной и контрольной форели при инкубации

Линия	Отход		Закладка икры		Выклев личинок		Масса личинок	
	мл	шт.	на инкубацию, шт.	% оплодотворения	шт.	%	общая, мг	% жел. мешка
1-я	320	3516	20463	98,6	16947	82,2	90,75	32,7
2-я	400	3809	22879	99,1	19070	83,4	105,4	33,8
3-я	300	2777	20104	97,8	17327	86,2	108,2	24,4
4-я	200	2222	20283	85,4	18061	89,1	89,6	35,3
К	—	—	20978	99,2	Нет данных		128,5	14,9

В 4-м и 5-м вариантах наблюдали дружные вылупления личинок форели с небольшой гибелью икры в период инкубации, однако масса личинок была достоверно ниже при вылуплении, чем в первых трех вариантах, и ниже, чем в контроле (см. табл. 4). Запас питательных веществ был самым низким у контрольных личинок при вылуплении. Вылупление личинок произошло через 348,6 дн., и судя по коэффициенту вариации, не различалось по времени между 1, 2-м и 3-м вариантами (CV, %=6,4%) и в 4-м и 5-м (CV, %=14,5%).

Выращивание молоди проводили в бассейнах отдельно по вариантам. Темп роста закономерно снижался с возрастом у молоди форели во всех вариантах (табл. 5).

Таблица 5

Показатели удельной скорости роста у второго поколения потомства самца, обработанного метилтестостероном, в %

Возраст, сут.	Варианты					
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	К
86-97	9,78	10,55	5,82	11,89	22,03	11,53
98-131	8,23	9,58	9,38	7,61	9,77	4,78
132-167	7,09	2,16	4,92	4,92	4,29	1,09

При завершении выращивания молоди форели оценили корреляционные связи между длиной тела рыбы, наименьшей высотой и массой гонад и регрессионную зависимость между длиной рыбы и наименьшей высотой тела (табл. 6).

Таблица 6

**Корреляционные связи между показателями длины тела (X), наименьшей высоты тела (Y), массы гонад (Z) у форели и регрессионная зависимость между длиной тела (X) и наименьшей высотой (Y) в возрасте 5,5 мес. от выклева личинок из икры**

Вариант	N, шт.	$r_{xyz}$	$t_r > 3\sigma$	$r_{xy}$	$t_r > 3\sigma$	$R_{xy}$
1-й	10	0,622	2,25>	0,915	6,43>	0,121
2-й	22	—	—	0,204	0,95<	0,058
3-й	9	0,078	-0,21<	-0,069	0,19<	—
4-й	17	—	—	0,954	12,7>	0,223
5-й	25	0,806	6,53>	0,628	3,96>	0,736
К	10	-0,046	0,13<	0,474	1,62<	0,085

Выявили высокодостоверные положительные корреляционные связи между длиной тела у молоди форели, наименьшей высотой тела и массой гонад в 1-м и 5-м вариантах, между длиной тела у молоди форели и наименьшей высотой в 1, 4-м и 5-м вариантах. В потомстве самок и самцов элитной группы (5-й вариант) положительная регрессионная зависимость выявлена между длиной и наименьшей высотой тела рыб (см. табл. 6). Во всех остальных вариантах степень корреляционной связи недостоверна. На основании проделанного статистического анализа можно сделать вывод, что в эксперименте на протяжении всего опыта использовали в 1-м и 5-м вариантах сибсов, а в 4-м варианте — полусибсов, так как только в этих вариантах были получены однородные высокодостоверные показатели корреляционной связи между изучаемыми признаками и положительная регрессионная зависимость между длиной тела рыбы и ее наименьшей высотой (см. табл. 6). В контроле использовали разнородную молодь форели, полученную от производителей из того же поколения, что и экспериментальная рыба, но не после близкородственного скрещивания. Выживание форели в вариантах 2, 3-м и 4-м было в 1,6 раз выше, чем в 1-м и 5-м, что, возможно, объясняется проявлением эффекта близкородственного скрещивания в 1-м и 5-м вариантах.

У самок форели из 1-го и 5-го вариантов гонады были на II–III стадиях зрелости со сформировавшимися яйценосными пластинками, имели ооциты в фазе протоплазматического роста, на разных ступенях оогенеза, что подтверждается высоким показателем изменчивости гонадо-соматического индекса  $CV=106\%$  (табл. 7).

У части самок из 3-го варианта гонады находились на III стадии зрелости, их гонадосоматический индекс существенно не отличался у рыб (см. табл. 7). Другая часть форели из этого варианта опыта имела ювенильные гонады. В контроле самцы имели I стадию зрелости гонад: в них были сперматогонии типа В

Таблица 7

**Результаты исследования гонад у потомства самца, обработанного метилтестостероном во 2-м поколении**

Вариант	Самки, %	ГСИ самок, % CV, %	Стадия зрелости самок форели	Самцы и ювенильные рыбы, %
1-й	50	0,053/106	11–111	30
	20	0,0035/25		
2-й	—	—	—	100
3-й	55,5	0,056/10,2	111	44,5
4-й	—	—	—	100
5-й	62,5	0,161/21,9	11–111	37,5
К	61,5	0,055/12,8	1	38,5



в семенных ампулах и клетки тестикулы с округлыми ядрами в активном состоянии. У контрольных самок ооциты, окруженные фолликулярными клетками в один слой, находились на I ступени периода протоплазматического роста, т.е. на II стадии зрелости. В 1-м и 5-м вариантах гонады у форели развивались одинаковыми темпами, находились на II–III стадии зрелости, то же сходство в степени развития гонад наблюдали и у форели из 2-го и 4-го вариантов, имевших ювенильные гонады. Форель из 3-го варианта по своим рыболовным показателям была ближе к «производственному» контролю.

**З а к л ю ч е н и е.** За период экспериментального выращивания потомства самца, обработанного метилтестостероном во 2-м поколении, не выявили существенных отличий между экспериментальной и производственной форелью даже при близкородственном скрещивании рыбы. Предположение о модификационном воздействии метилтестостерона на лососевых рыб на ранних этапах онтогенеза при искусственной обработке им рыбы не подтвердилось при рыболовно-биологическом обследовании двух поколений потомства от самца, обработанного метилтестостероном.

### ЛИТЕРАТУРА

- Аквакультура России в период до 2005 года. Федеральная программа. 84 с.
- Ананьев В.И., Метальникова К.В., Манохина М.С. 1999. Возможности применения методов реверсии пола и криоконсервации спермы для сохранения генетического разнообразия рыб // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Вып.1. С.30–34.
- Метальникова К.В. 1988. Влияние метилтестостерона и тестостерон-пропионата на гаметогенез лососевых рыб // Материалы IV Всесоюзной конференции по раннему онтогенезу рыб. Ч.11. С.8–10. 1991. Регуляция пола у радужной форели // Рыбное хозяйство. №12. С.35–38. 1991. Потомство реверсантов стальноголового лосося // Рыбное хозяйство. №2. С.35–38. 1992. Влияние синтетических аналогов тестостерона на передифференцировку пола у стальноголового лосося *Oncorhynchus mykiss* (Walb.). Автореф. дисс. на соиск. уч.ст.канд. биол. наук. 16 с.
- Метальникова К.В., Бурцев И.А. и др. 1989. Методические рекомендации по получению однополого женского потомства стальноголового лосося. 16 с. М.: изд-во ВНИРО
- Метальникова К.В., Голубев В.А. 2000. Получение потомства форели от реверсантов в нерестово-выростном хозяйстве «Прибрежное» (Калининградская обл.) // Рыбное хозяйство. Сер. Пресноводная аквакультура. Вып.4. С.19–24.
- Канидьева А.Н. и др. 1985. Инструкция по разведению радужной форели. ВНИИПРХ. 60 с.
- Кирпичников В.С. 1987. Генетика и селекция рыб. С-Пб.: Наука. 520 с.
- Паушева З.П. 1988. Практикум по цитологии растений. 262 с.
- Правдин И.Ф. 1996. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). 376 с.
- Рокицкий П.Ф. 1966. Основы вариационной статистики. 168 с.
- Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. 718 с.
- Строганов Н.Н. 1981. Особенности газообмена животных в водной среде // Руководство по физиологии. Ч.2. С.264–273.
- Урбах В.Ю. 1963. Математическая статистика для биологов и медиков. 323 с.
- Чугунова Н.И. 1959. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М. 164 с.
- Annual report NXXXYL. Report for the year ended 31<sup>th</sup> December 1991 // The Annual Reports of the Salmon Research Agency of Ireland Incorporated Follow in Sequence to Those of Its Predecessor. The Salmon Research Trust of Ireland Incorporated. Farran Laboratory. Newport. Co. Mayo. 855-CK ICES Cooperative Res. Rep. Rep.Des.Res. Col. N.233. May 1999.
- Bye V.J. et. al. 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) // Aquaculture. 57. P.35–50.
- Choy L. Hew et. al. 1996. Determination of genomic sex in salmonids // Patent USA N.5480774. P.35–50.
- Fish Farming International. 2000 // V.27. N.3. P.12–13.
- Metalnikova K.V. Simulated hormon-genetic regulation of reproduction in salmon // In: 20<sup>th</sup> Conference of European Comparative Endocrinologists. P.106.