

РЫБНОЕ ХОЗЯЙСТВО

МРНТИ 69.25.13

¹А.Н.Туменов, ²Н.Х.Сергалиев, ¹Б.Т.Сариев, ¹С.С.Бакиев

¹Западно-Казахстанский аграрно-технический университет
им. Жангир хана, г. Уральск, Казахстан

²Актюбинский региональный государственный университет
им. К. Жубанова, г. Актобе, Казахстан

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД ОСЕТРОВЫХ РЫБ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ УЗ-СКАНЕРА И БИОПСИИ ПО ЗНАЧЕНИЯМ КОЭФФИЦИЕНТА ПОЛЯРИЗАЦИЙ ООЦИТОВ

Аннотация. В статье описывается технология определения стадий зрелости гонад и коэффициента поляризации ядер ооцитов с помощью УЗИ-диагностики и биопсии на поздних этапах развития осетровых рыб, выращиваемых в искусственных условиях. Лабораторные работы проводились на основе методов прижизненного получения икры, биопсии и УЗИ-диагностики. В качестве объектов исследования использована икра самок осетровых рыб: сибирского осетра, стерляди и гибридов бестера (белуга х стерлядь) и ролека (русский осетр х ленский осетр) в возрасте от 5 до 21 лет. Показано, что применение коэффициента поляризации ядер ооцитов дает более точный результат на стадии определения зрелости гонады осетровых рыб и точность срока естественного выхода икры возрастает до 93,54 % и более.

Ключевые слова: осетровые рыбы, стадия зрелости гонад, УЗИ-диагностика, коэффициент поляризации, окуляр-микроскоп, биопсия гонад, ооцит, УЗИ.

* * *

Түйіндеме. Бұл мақалада жасанды жағдайда өсірілген бекіре тұқымдас балықтардың ооцит ядроларының поляризациялық коэффициентін және ультрадыбыстық диагностикадан өткізу жолымен гонадаларының жетілу стадиясын анықтау технологиясы сипатталады. Зертханалық зерттеу жұмыстарын ұйымдастыру барысында уылдырықтарды тірі балықтан өлтірмей алу, ультрадыбыстық диагностика, биопсия әдістері қолданылды. Зерттеу

жұмыстарын жүргізу үшін бекіретұқымдас балықтарының: сібір бекіресі, сүйірік, және бестер будандары (қортпа х сүйірік) және ролек (орыс бекіресі х лена бекіресі) 5 тен 21 жас аралығындағы аналықтарының уылдырықтары пайдаланылды. Бекіре тұқымдас балықтар гонадасының жетілу кезеңін анықтау кезінде, аналық жұмыртқа ядросынның поляризация коэффициентінің анықтау әдісін қолданғанда уылдырықтың табиғи шығымы 93,54% артады.

Түйінді сөздер: бекіре балықтар, гонаданың пісіп-жетілу кезеңі, ультрадыбыстық диагностика, поляризация коэффициенті, окуляр-микрометр, гонада биопсиясы, ооцит, тұйық жүйемен суды камтамасыз ететін қондырғылар.

* * *

Abstract. This article describes the technology of identification of maturity stage of gonads and the coefficient of core polarization of the oocyte with the help of ultrasound diagnosis and biopsy in the later stages of development of the sturgeon fish, grown in artificial conditions. Laboratory works were carried out on the basis of vivo methods of obtaining fish roe, biopsy and ultrasound diagnostics. As the object of study, it was chosen the fish roe of female sturgeon: siberian sturgeon, starlet hybrids and bester (beluga x sturgeon) and rolek (Russian sturgeon x Lena sturgeon) between ages of 5 to 21. It is shown that the application of core polarization of oocytes give a more accurate result in definition of the maturity stage of gonad of sturgeon fish and the accuracy of natural exit of fish roe rises to 93.54% or more.

Key words: sturgeon fish, gonad maturity stage, ultrasound diagnostics, polarization coefficient, ocular-micrometer, gonadal biopsy, oocyte, RAS.

Введение. В период полового созревания рыб масса их гонад (семенников и ястыков) возрастает в результате деления половых клеток. До определенного момента гонады самцов и самок не различаются по массе. Однако в последний период перед нерестом происходит активное накопление питательных веществ в ястыках и поэтому разница в массе ястыков и семенников перед нерестом становится весьма существенной [1].

Только в условиях искусственного разведения осетровых рыб можно в значительной мере повлиять на скорость развития гонад, регулируя температурный режим. Так, в условиях тепловодных хозяйств половая зрелость самцов осетра наступает в возрасте 3-4 лет, а самок – в возрасте 6-7 лет. Стерлядь созревает в более ранние сроки: самцы – в 2-3 года, самки – в 3-

4 года. Оптимальная температура воды для нереста производителей 13-16 °С [2].

Продолжительность отдельных стадий зрелости половых желез влияет на время наступления зрелости и характер половых циклов. Время наступления половой зрелости зависит прежде всего от продолжительности I и II стадии зрелости, т. е. от продолжительности периода превителлогенеза (протоплазматического роста ооцитов) [3].

Для определения стадий зрелости гонад осетровых рыб используют несколько методов. Наиболее распространенные из них – это традиционная биопсия и определение при помощи неинвазивного экспресс-метода УЗИ. Работа по определению стадий зрелости гонад с помощью метода УЗИ-диагностики детально описана в трудах М.С. Чебанова и др. [4,5]. При искусственном разведении осетровых рыб в регулируемых условиях одним из актуальных вопросов является применение эффективных методов отбора зрелых производителей для зимовки и дальнейшего получения от них зрелых половых продуктов [6,7]. Исследования были направлены на оценку эффективности комбинированного применения методов УЗИ и биопсии гонад по значениям коэффициента поляризации ооцитов при отборе зрелых производителей.

Материалы и методы исследования. Бонитировку маточного стада и старших ремонтных групп сибирского осетра, стерляди, гибридов бестера (белуга х стерлядь) и ролека (русский осетр х ленский осетр) в возрасте от 5 до 21 года, проводили в период с 16 по 27 мая 2016 г. в Западно-Казахстанском аграрно-техническом университете им. Жангир хана на базе Научно-исследовательского института биотехнологии и природопользования (рис. 1).

На первом этапе отбора все производители подвергались УЗИ-диагностированию, по итогам которого были отобраны производители со стадиями зрелости IV. Отобранные и отсаженные производители на следующем этапе подвергались биопсии.

Биопсия гонад, осуществляется путем введения через боковые мышцы специального щупа, который извлекает частицу



а) б)
Рис. 1. Проведение УЗИ-диагностики гонад осетровых рыб:
а) УЗИ-диагностика; б) сканирование половых гонад

гонады. Для расчета коэффициента поляризации не менее 10 ооцитов, извлеченных от каждой самки, фиксируют путем кипячения в физиологическом растворе в течение 2 мин. Предварительно до фиксации икры термостойкий стакан с физиологическим раствором прогревают на лабораторной плитке до 100 °С (рис. 2).

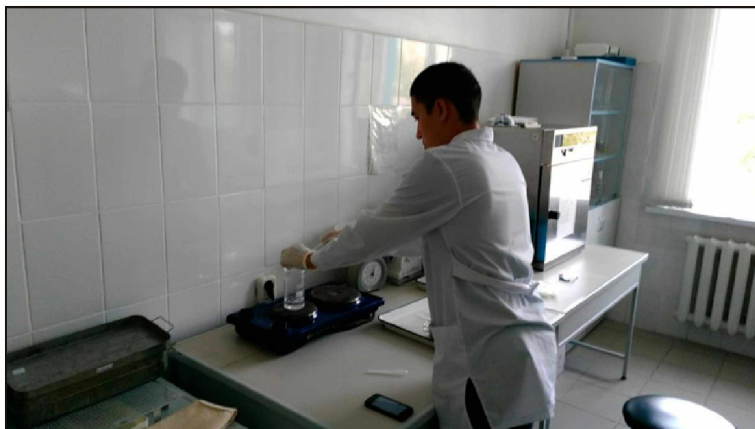
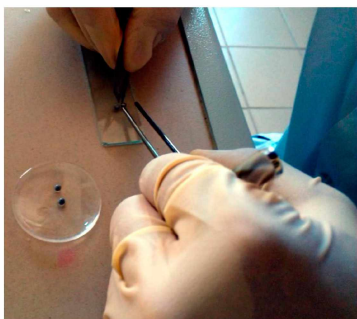
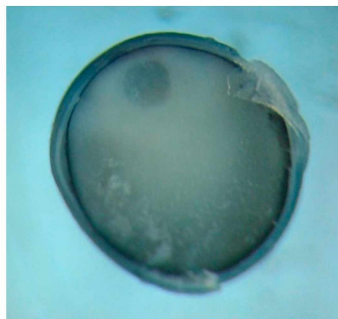


Рис. 2. Фиксация ооцитов осетровых путем кипячения

Далее в стакан помещают икру из одной пробирки. После фиксации раствору дают остыть и затем икру вынимают пипеткой. Для предотвращения высыхания препарата ооциты должны находиться в физиологическом растворе. Фиксированные ооциты выкладывают на предметное стекло и разрезают посередине в меридиональном направлении лезвием (рис. 3). Затем разрезанные в меридиональном направлении ооциты изучают под биноклем, оснащенный окуляр-микрометром.



а)



б)

Рис. 3. Разрез фиксированных ооцитов: а) процесс разреза ооцита; б) вид разрезанного в меридиональном направлении ооцита, увеличенного под биноклем

Для расчета величины коэффициента поляризации ядер ооцита на разрезе измеряют наибольшее расстояние от анимального до вегетативного полюса L и расстояние от анимального полюса до верхнего края ядра I , после чего рассчитывают коэффициент поляризации. Толщиной оболочек при этом пренебрегают.

Расчет величины коэффициента поляризации ядер ооцита K_n выполняется по формуле :

$$K_n = I/L \quad (1)$$

где K_n – коэффициент поляризации;

I – расстояние от анимального полюса до верхнего края ядра;

L – наибольшее расстояние от анимального до вегетативного полюса.

Все полученные данные вносились в специализированные таблицы, разработанные М.С. Чабановым [5]. Самок условно делили на разные группы в зависимости от коэффициента поляризации ядер ооцита. По данным М.С. Чабанова, коэффициент поляризации K_p расшифровывается следующим образом:

$K_p < 0,05$ – перезревшие отсаживаются на нагул;

$K_p = 0,05-0,10$ – зрелые 1 при достижении нерестовых температур немедленно инъецируются любым препаратом;

$K_p = 0,10-0,12$ – зрелые 2 при достижении нерестовых температур могут выдерживаться в течение 2-3 суток;

$K_p = 0,12-0,15$ – близкие к созреванию;

$K_p = 0,15-0,18$ – способные к созреванию;

$K_p = 0,18 <$ – незрелые.

В результате диагностики с помощью УЗИ-сканера было выявлено, что 37 производителей находятся на IV стадии зрелости. Видовой состав отобранных производителей выглядит следующим образом: сибирский осетр – 10, гибрид бестера – 9, гибрид ролека – 8, стерлядь – 10.

Результаты исследований поляризации ядер ооцитов методом биопсии показали, что перезревшие особи отсутствуют, зрелые 1-й категории составляют 48,64 %, зрелые 2-й категории – 13,52 %, близкие к созреванию – 21,62 %. Оставшихся отнесли к незрелым, доля которых составляет 16,22 % (таблица). В ходе определения коэффициента поляризации ядер осетровых рыб было выявлено, что оболочки ооцитов сформированы без каких-либо нарушений. В цитоплазме не отмечено никаких аномальных включений. Коэффициент поляризации ядра изменялся в соответствии с биологическими особенностями развития ооцитов у данного вида рыб, так как выращиваемые рыбы находятся в довольно хороших условиях.

Для проверки достоверности полученных результатов в соответствии с технологией получения половых продуктов в искусственных условиях, с соблюдением температурного режима все отобранные производители были помещены в специальные

**Результаты расчета коэффициента поляризации
ядер ооцитов производителей**

№	Вид рыбы	Возраст рыбы, год	I, мкм	L, мкм	K_p	№	Вид рыбы	Возраст рыбы, год	I, мкм	L, мкм	K_p
1.	Сибирский осетр	14+	60	620	0,09	20.	Ролек	21+	50	450	0,1
2.	Сибирский осетр	16+	80	620	0,12	21.	Ролек	16+	80	600	0,13
3.	Сибирский осетр	17+	70	560	0,12	22.	Ролек	15+	70	600	0,1
4.	Сибирский осетр	15+	90	500	0,18	23.	Ролек	19+	60	500	0,12
5.	Сибирский осетр	18+	90	600	0,15	24.	Ролек	17+	100	500	0,2
6.	Сибирский осетр	14+	70	570	0,12	25.	Ролек	18+	80	550	0,14
7.	Сибирский осетр	17+	80	610	0,13	26.	Ролек	16+	60	550	0,1
8.	Сибирский осетр	17+	70	640	0,1	27.	Ролек	15+	60	650	0,09
9.	Сибирский осетр	15+	50	600	0,08	28.	Стерлядь	6+	80	540	0,1
10.	Сибирский осетр	16+	90	500	0,18	29.	Стерлядь	7+	60	520	0,1
11.	Бестер	14+	90	650	0,13	30.	Стерлядь	6+	80	530	0,15
12.	Бестер	16+	80	540	0,14	31.	Стерлядь	8+	50	520	0,09
13.	Бестер	16+	60	600	0,1	32.	Стерлядь	5+	60	540	0,1
14.	Бестер	15+	80	650	0,12	33.	Стерлядь	6+	90	500	0,18
15.	Бестер	14+	90	500	0,19	34.	Стерлядь	5+	40	550	0,07
16.	Бестер	18+	60	570	0,1	35.	Стерлядь	7+	50	550	0,09
17.	Бестер	16+	60	650	0,09	36.	Стерлядь	8+	80	540	0,14
18.	Бестер	17+	50	550	0,09	37.	Стерлядь	6+	50	540	0,09
19.	Бестер	14+	90	500	0,18						

бассейны с охлажденной водой (чиллер) для зимовки. По истечению 2-х месяцев в соответствии с технологией прижизненного получения икры проведена работа по получению половых продуктов у производителей.

В результате проведенных работ по получению икры прижизненным способом 78,37 % производителей дали икру в намеченное время достаточно хорошего качества. Анализ показал, что производители, относящиеся к "зрелым 1" и "зрелым 2" категории полностью отдали икру. Из оставшихся, не отдавших икру производителей, на долю "близки к созреванию" приходится 5,41 %, относящихся к категории "незрелым" –16,22 %. Из полученных данных следует, что из категории "близки к созреванию" 75 % дали икру, а от производителей, относящихся к "незрелым", икру получить не удалось.

Обсуждение результатов. При исследовании половых гонад осетровых с помощью УЗ-сканера значительно сокращается время диагностики стадии зрелости гонад. Исследуемые особи практически не травмируются, при этом у метода имеются свои недостатки. Опыты показали, что при УЗ-сканировании точно определить стадию зрелости гонад особенно на IV незавершенной стадии, очень сложно, процент ошибок очень велик. Для получения половых продуктов нужно, чтобы гонады были на IV завершенной стадии зрелости.

Однако массовое применение метода биопсии затруднительно, так как рыба травмируется и много времени уходит на обработку материала. Следует отметить, что в гонадах рыб в период нагула или очень упитанных рыб жировой ткани значительно больше, чем генеративной, и попасть щупом именно в генеративную часть гонад не всегда удается. Поэтому этот способ применим при тестировании только зрелых самцов и самок, начиная с III стадии зрелости гонад. Применение комбинированной технологии отбора производителей, т. е. на начальном этапе отбор УЗИ-сканером, затем применения метода биопсии гонад по значениям коэффициента поляризации ооцитов дает более эффективный результат.

Ошибка при определении стадии зрелости гонад приводит

к тому, что рыба испытывает большой стресс (зимовка, применение стимулирующих препаратов, постоянный осмотр рыбоводов и т.д.), происходит резорбция икры и возможны даже летальные исходы.

Выводы. Таким образом, учитывая данные поляризации ядер, от отобранных рыб для зимовки икру получили у 93,54 % производителей против 78,37 %, если бы отбор рыб производился только при помощи УЗ-сканера. Следовательно, применение коэффициента поляризации ядер ооцитов осетровых рыб в качестве дополнительного метода определения стадии зрелости дает более точный результат.

При определении коэффициента поляризации ядер ооцитов осетровых рыб, точность срока естественного выхода икры возрастает до 93,54 % и более.

Список литературы

1 *Иванов А.А.* Физиология рыб: учеб. пособие: 2-е изд. – СПб.: "Лань", 2011. – С. 203-204.

2 *Кривошеин В.В., Барышев А.А.* Биотехнология воспроизводства осетровых рыб в аквакультуре // Актуальные проблемы и перспективы развития АПК. – Иваново, 2005. – С. 193-194.

3 *Шихшабеков М.М., Рабазанов Н.И., Адуева Д.Р.* Причины, последствия и биологическое значение резорбционных процессов в яичниках рыб: Междунар. науч.-практ. конф. // Проблемы изучения, сохранения и восстановления водных биол. ресурсов в 21 веке. – Астрахань, 2007. – С. 74-75.

4 *Чебанов М.С., Галич Е.В., Чмырь Ю.Н.* Руководство по разведению и выращиванию осетровых рыб. – М.: ФГНУ "Росинформагротех", 2004. – С. 13.

5 *Чебанов М.С., Галич Е.В.* Ультразвуковая диагностика осетровых рыб. – Краснодар: Просвещение – Юг, 2010. – 135 с.

6 *Linares-Casenave J., van Eenennaam J.P., Doroshev S.I.* Ultrastructural and histological observations on temperature induced follicular ovarian in the white sturgeon // J.Appl.Ichthyol. 2002. – Vol. 18 (4-6). – P. 382-390.

7 Ludwig A., Belfiore N., Pitra C. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus) // Genetics. – 2001. – Vol. 158. – P. 1203-1215.

Туменов А.Н., кандидат сельскохозяйственных наук, магистр,
e-mail: artur_tumen@mail.ru

Сергалиев Н.Х., кандидат биологических наук, ассоциированный профессор, e-mail: nurlan-sergaliev@yandex.kz

Сариев Б.Т., кандидат биологических наук, магистр,
e-mail: sariev-84@mail.ru

Бакиев С.С., студент 4-го курса РХиПР, e-mail: serik_2595@mail.ru

Регистрационное свидетельство № 7528-Ж
от 01.08.2006 г.
выдано Министерством культуры и информации
Республики Казахстан

Отв. редактор Л.Н.Гребцова
Редактор А.А.Козлова
Редактор текста на казахском языке С.А.Оскенбай
Редактор текста на английском языке Г.А.Айтжанова
Компьютерная верстка и дизайн С.А.Дерксен
Обложка Е.С.Кадырова, Л.Н.Гребцовой

Подписано в печать 05.10.2016.
Формат 60x84/16. Печать офсетная. Бумага офсетная.
Усл. п. л. 8,5. Тираж 350 экз. Заказ 106.

Редакционно-издательский отдел НЦ НТИ.
050026, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 221