

УДК 595.36:57.017.55:577.175.26

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОЛА ГИГАНТСКИХ ПРЭСНОВОДНЫХ КРЕВЕТОК *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DE MAN, 1879)
УДАЛЕНИЕМ АНДРОГЕННОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Нгуен Тхи Туэт, аспирант, Астраханский государственный технический университет, Российская Федерация, 414025, Астрахань, ул. Татищева, 16, ngocha2008@mail.ru

Виктор Николаевич Крючков, доктор биологических наук, профессор, Астраханский государственный технический университет, Российская Федерация, 414025, Астрахань, ул. Татищева, 16, kvn394@rambler.ru

В работе представлены результаты исследований по изменению пола *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) при помощи удаления андрогенной железы, влияющей на формирование пола по мужскому типу. В данном исследовании использовались гистологические, морфометрические и статические методы. Морфогистологическая характеристика половой системы была изучена на ранних стадиях развития креветки. Показано, что на стадии PL 25–50 гонады ещё не достигли полного развития. Удаление андрогенной железы на этих стадиях приводит к транссексуализации самцов в самок. Изучено становление гонад по женскому типу у креветок с мужским генотипом после удаления андрогенной железы. У данных псевдосамок не имелось мужских отростков, а половые отверстия расположены на коксах третьей пары. Проведенное исследование позволяет определить стадии, на которых пол креветок может быть изменен, в результате чего возможно образовывать фальшивых самок. Статья представляет интерес для специалистов по направлениям «Гидробиология» и «Аквакультура и водные биоресурсы».

Ключевые слова: гигантские пресноводные креветки, железы андрогена, изменение пола, переопода, размерно-весовая категория, фальшивые самки, (псевдосамки), мужские отростки, гонопоры креветок, гонады креветки, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)

**SEX CHANGE OF THE GIANT FRESHWATER PRAWN
MACROBRACHIUM ROSENBERGII (DE MAN, 1879)
BY REMOVAL OF THE ANDROGENIC GLAND**

Nguyen Thi Tuyet, post-graduate student, Astrakhan State Technical University, 16 Tatishev Str., Astrakhan, 414025, Russian Federation, ngocha2008@mail.ru

Kryuchkov Victor Nickolaevich, Ph.D. (Biology), Professor, Astrakhan State Technical University, 16 Tatishev Str., Astrakhan, 414025, Russian Federation, kvn394@rambler.ru.

In the paper presents the results of studies on sex change *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) by removing the androgenic gland, which affects the formation of male sex type. This study used histological, morphometric and static methods. Morpho-histological characteristics of the reproductive system have been studied in the early stages of the shrimp. Shown in stages PL 25-50 gonads not yet reached full development. Removal of androgenic glands at these stages comes to sex reversal from males to females. The formation of the gonads per female type in shrimp with male genotype studied after removal of androgenic gland. These "neofemales" were not had appendix masculine, and gonopore complexes located on the third pair coxae's. The study to determine the stage, at which the gender shrimps can be changed, as a result of which it is possible to form neofemales. The article is interest for engineers and specialists in the field "Hydrobiology" and "Aquaculture and aquatic resources".

Keywords: giant freshwater prawn, gland androgen, sex change, trunk leg, size-weight category, fake females (neofemales), appendix masculine, gonopore complexes of shrimp, gonads of shrimp, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)

Разведение гигантских пресноводных креветок было начато более 30 лет и на сегодняшний день распространено по всему миру. Годовой объём производства в аквакультуре достигает прироста примерно 23,5 %. Во многих странах Индо-Вост-Пацифики выращивание креветок даёт высокую экономическую выгоду за счёт продажи креветок и создания дополнительных рабочих мест на креветочных фермах (Таиланд, Китай). Тем не менее, технология выращивания этого вида до сих пор постоянно меняется. Так, перспективным является выращивание креветок мужского пола, заметно отличающихся от самок более интенсивным ростом: самые крупные самцы достигают массы 250 г и больше, по сравнению с самками, масса которых составляет всего лишь 119 г [4]. По исследованию индийских учёных, выращивание только самцов креветок *Macrobrachium rosenbergii* позволяет иметь большую прибыль, чем выращивание только самок (60 %) и смешанного выращивания (63 %) [9].

В некоторых странах производство только самцов гигантских пресноводных креветок вручную либо в силу ряда почти невозможно, либо экономически невыгодно. Поэтому в настоящее время перед аквакультурой десятиногих раков стоит важная задача разработки и усовершенствования технологий, которые позволят повысить рентабельность выращивания. Одной из таких технологий является создание фальшивых самок при удалении андрогенной железы самцов в возрасте 30–60 дней после метаморфоза (стадия PL 30–60). Железой продуцируются гормоны, изменяющие пол ракообразных и стимулирующие образование парных семенников у самцов [7]. Это похоже на активность клеток Лейдига, вырабатывающих мужской половой гормон у млекопитающих и человека. Разница в том, что клетки Лейдига (гормонопродуцирующие клетки) расположены между семенными канальцами в семенниках, а мужские железы (андрогенная железа) креветок расположены в конце семенных протоков.

Удаление андрогенной железы у самцов на ранних стадиях способствует трансексуализации самцов в самок ($\text{♂} \rightarrow \text{♀}$). Исследователи Sagi и Cohen [8] показали, что при скрещивании фальшивых самок с нормальными самцами гигантских пресноводных креветок образуются стада креветок, где доля самцов достигает 99,1–100,0 %. Результаты данного эксперимента подтверждают, что технология создания псевдо-самок даёт возможность производства только особей мужского пола в аквакультуре. Но, к сожалению, при проведении манипуляции по удалению железы андрогена возникает проблема [6] в определении пола креветок на ранних стадиях. Так, для решения этого вопроса E.D. Aflalo, T.T.T. Hoang и др. [5] приводят результаты усовершенствования технологии производства креветок *Macrobrachium rosenbergii* с большим количеством самцов. Технология осуществляется в два этапа: на первом этапе андрогенные железы креветок вырезаются в периоде 30–60 дней после метаморфоза (PL 30–60). Получившиеся в результате фальшивые самки этого этапа размножаются с нормальными самцами, производя потомство только мужского пола. На втором этапе из потомства креветок, полученных на первом этапе, создаются такие же фальшивые самки при помощи удаления мужской железы на стадии 20–30 дней (PL 20–30).

Целью данного исследования являлась оценка изменения пола *Macrobrachium rosenbergii* с удалёнными андрогенными железами и изучение развития половой системы.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служила гигантская пресноводная креветка (*Macrobrachium rosenbergii*) в возрасте 25 дней после метаморфоза. Сбор гидробионтов, а также проведение экспериментальной работы выполнялось на базе малого инновационного предприятия «Эко-тропик» АГТУ. В работе использовались гистологические, морфометрические и статические методы [1; 3].

Гистологические препараты приготавливали по общепринятым методикам. Объекты фиксировались раствором Буэна. Полученные срезы окрашивались гематоксилин-эозином. Фотографирование серий микропрепаратов осуществляли в эко-

лого-гистофизиологической лаборатории кафедры «Гидробиология и общая экология» АГТУ на микроскопе фирмы «Olimpus BH-2» и стереоскопическом микроскопе «Микромед МС-2-Z00М», вариант 2CR, при помощи цифровой фотокамеры «Sony» и видеоокуляра «DCMC 510 Scope».

Обработка полученных микроснимков (изображений) срезов проводилась при помощи пакетов программного обеспечения «Scope Photo 3.0» («Scope Tek[®]») и «Adobe Photoshop CS6 Extender».

Морфометрический анализ заключался в определении скорости роста (ΔT) по формуле [2]:

$$\Delta T = \frac{\Delta w}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

где Δw – изменение массы, при этом $\Delta w = w_2 - w_1$; w_1 и w_2 – начальный и конечный вес особи; t_1 – начальное время; t_2 – конечное время.

Статистическая обработка полученных результатов исследований осуществлялась при помощи интегральных пакетов «STATISTICA v. 6.0» и в среде компьютерной программы «Microsoft Excel».

Результаты исследований и их обсуждение

Особенность строения половой системы креветок исследовалась в начале стадии PL 25. На данной стадии развития самцы существенно не отличались от самок внешним и внутренним строением половой системы. По гистологической характеристике семенник или яичник, которые располагаются между сердцем и печенью креветок, еще не сформированы (рис. 1).

Визуальное определение пола креветок по внешнему строению возможно на стадии PL 30–45 под стереоскопическим микроскопом, когда начинает формироваться половое отверстие. Гонопоры у самцов расположены под коксальными выростами пятой пары переоподов и в середине пятой пары переоподов образуется твердая точка, а у самок – на коксах третьей пары. По результатам нашего исследования семенник креветок начинает формироваться на стадиях 55–60 дней после метаморфоза (рис. 2).

Как видно на рисунке 2, семенник ещё не имеет характерного дефинитивного строения. Семенник представлен группой клеток, расположенных между печенью и сердцем. Когда самцы достигают длины карапакса ≈ 1 см на 65–70 день после периода метаморфоза, то начинает образовываться мужской отросток, его полное развитие завершается где-то на 95-й день.

У самцов при формировании полового отверстия и «мужского отростка» в последующее время (70-й день развития) строение семенника становится уже более типичным (рис. 3). В семеннике просматривается уже характерная структура сперматогенных долек.

На стадии 70 дней после метаморфоза самки существенно отличаются от самцов в строении репродуктивных щетинок, входящих в состав выводковой камеры. В яичниках уже имеются оогонии с ядрами (рис. 4).

Полное развитие половой системы у гигантских пресноводных креветок происходит на стадии 65–70 дней после метаморфоза. Половая система самок состоит из парных яичников, яйцеводов и гонопор. Яичники расположены в головогруды дорсально по отношению к желудку и гепатопанкреасу. Яйцевой проток заканчивается гонопором, расположенным на внутренней поверхности абдомена между переоподами третьей пары. Половая система самца состоит из парных семенников, расположенных аналогично яичникам самок, семенных протоков и гонопор, открывающихся у начала пятой пары переоподов.

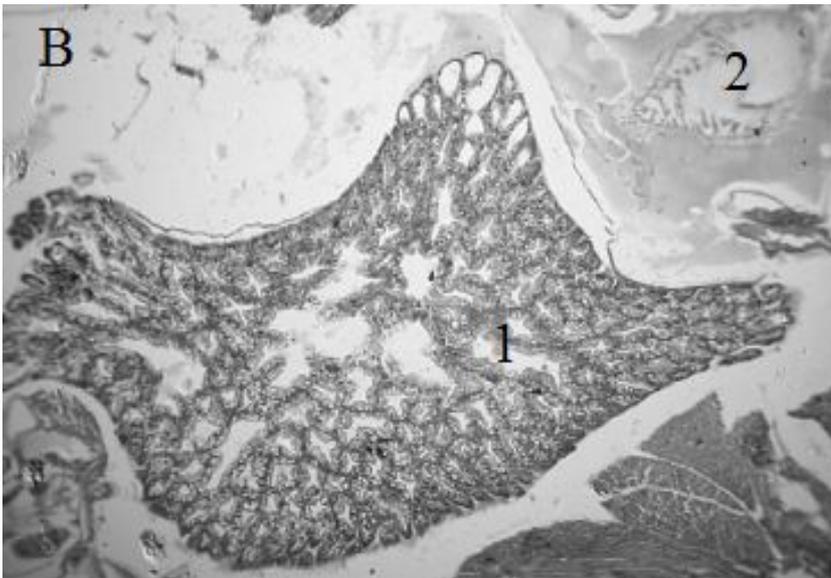
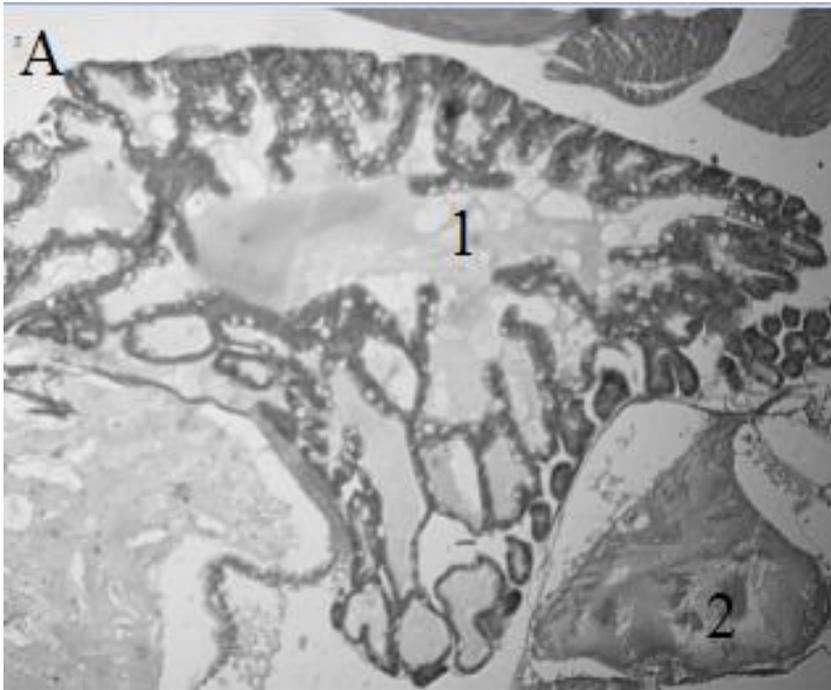


Рис. 1. Внутреннее строение креветки на стадии PL 25 (А) и на стадии PL 50 (Б):
1 – печень; 2 – сердце (окл. 20 × об. 40)

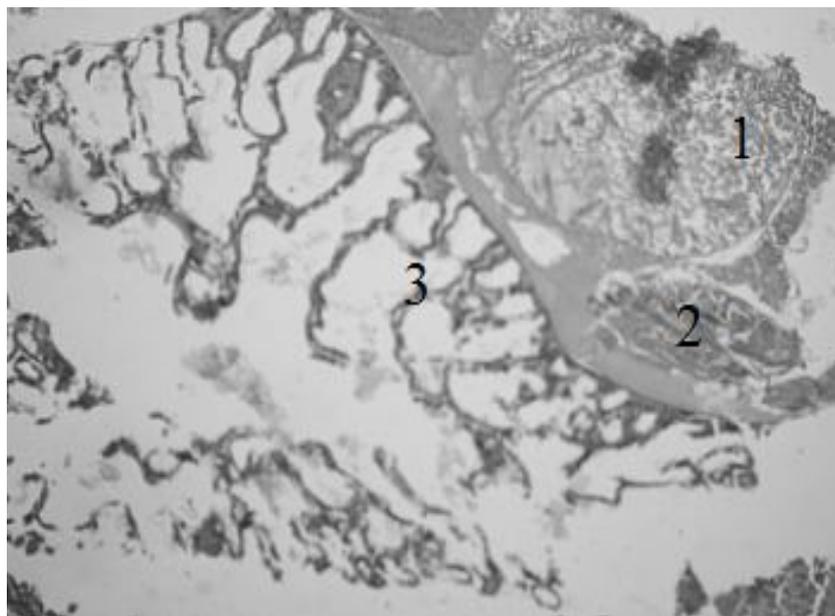


Рис. 2. Внутреннее строение креветки на стадии PL 55:
1 – сердце; 2 – семенник; 3 – печень (окл. 20 × об. 40)

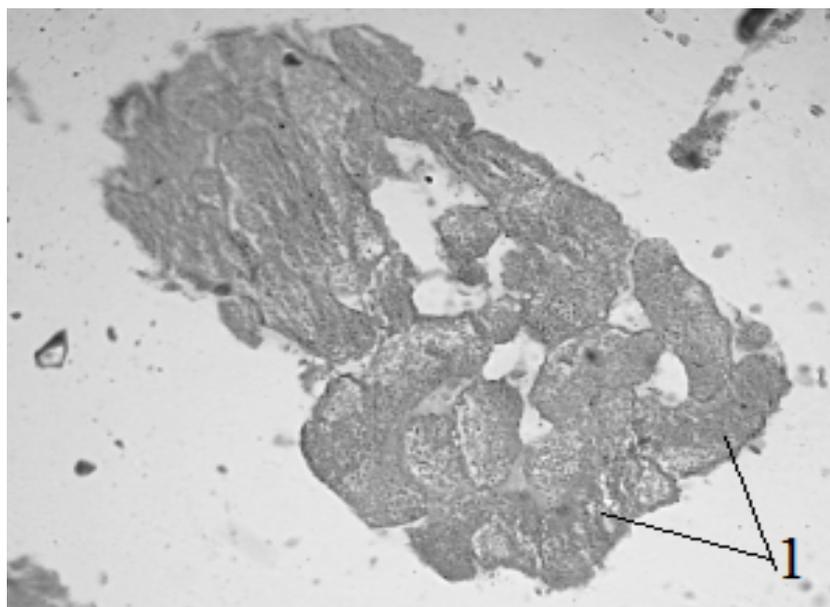


Рис. 3. Строение семенника креветок на стадии 70 дней после метаморфоза:
1 – сперматогенная долька (окл. 20 × об. 40)

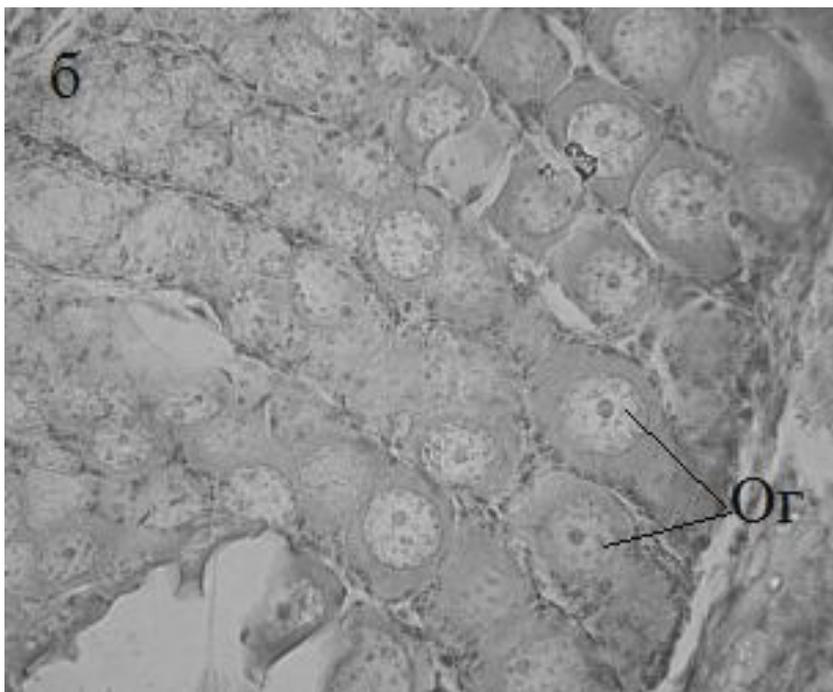
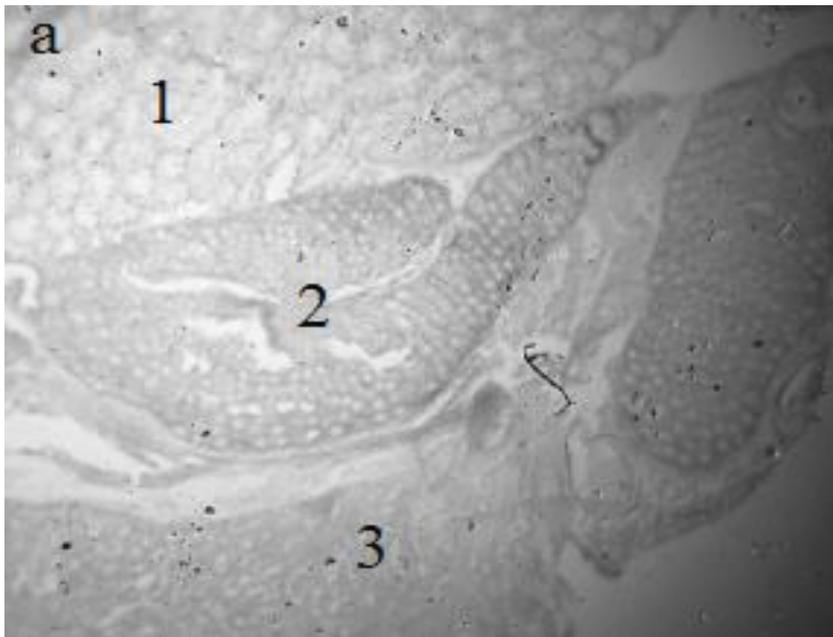


Рис. 4. Ячник креветок на стадии 70 дней после метаморфоза: 1 – печень; 2 – ячник; 3 – сердце, ОГ – оогоний (с увеличением (а) – окл. 20 × об. 40 и (б) – окл. 20 × об. 100)

Поскольку на стадии PL 25–60 семенник и яичник креветок ещё не получают полного развития, удаление андрогенной железы на этих стадиях приводит к трансексуализации самцов в самок. Нами выполнялось удаление железы андрогена самцов на разных стадиях: PL 30, PL 40, PL 50. На каждой стадии вырезали мужские железы у 15-ти самцов. Процесс удаления железы был проведен по следующей схеме:

1. Голова и хвост креветки фиксировались глиной или мокрой ватой (рис. 5).
2. Под стереоскопическим микроскопом, при увеличении в 30 раз, близлежащие части у основания пятой пары переоподов (ходильных ног) вырезались до глубины 1,0–1,5 мм специальными ножницами.
3. После вырезания хитинового покрова пятой пары переопода вместе с прозрачными волокнами извлекались маленькими пенцетами. Если прозрачное волокно – семенной проток с железой андрогена – не отделяется от креветки, то удаление железы андрогена не удастся.

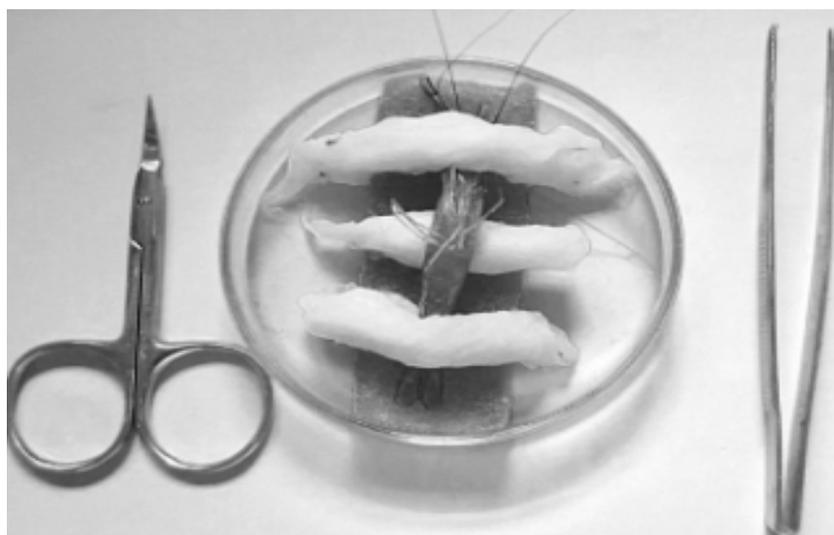


Рис. 5. Фиксирование креветок для микрохирургии

В процессе удаления железы андрогена было обнаружено, что манипуляции одновременного удаления двух переоподов пятой пары приводит к низкой выживаемости креветок. В связи с чем нами была предпринята попытка первоначально вырезать железу одной переоподы пятой пары, а через 2–3 сут. произведена последующая микрохирургическая операция по удалению второй переоподы. В результате чего наша попытка увенчалась успехом.

Креветки после микрохирургии выращивались в аквариумах при температуре 24–28 °С и двухразовым кормлением в день кормами животного (печень, селезёнка) и растительного (овощи) происхождения. После удаления мужской железы через 10 дней вырезали последние сегменты второй плавательной ножки. Спустя месяц проводили повторный опыт. Если последний сегмент второй плеоподы растёт без мужского отростка, это указывает на то, что в результате эксперимента были получены фальшивые особи самок с генотипом ZZ. В случае обратного, когда на вырезанных ножках растут мужские отростки, эксперимент считается неудачным.

Через 3 мес. нами были получены креветки («опытные») с измененной половой системой, рост которых в сравнении с группой сородичей из «контроля» различался (табл.).

Таблица

Рост креветок до удаления железы андрогена и после

Стадии Показатели	Опытная группа креветок, n = 15						Контрольная группа креветки, n = 20			
	PL 30		PL 40		PL 50		Самки		Самцы	
	Длина тела, см	Вес, г	Длина тела, см	Вес, г	Длина тела, см	Вес, г	Длина тела, см	Вес, г	Длина тела, см	Вес, г
до операции, w ₁	2,266	0,1676	2,895	0,3857	3,245	0,682	2,238	0,1552	2,255	0,1558
после начальной операции, 90 дней, w ₂	5,445	2,945	5,439	2,986	5,451	2,998	5,1516	3,125	5,594	3,164
ΔT	90		80		70		90		90	
ΔW, г	2,777		2,6		2,316		2,969		3,0	
Скорость роста, ΔT	0,030		0,0325		0,033		0,0329		0,0334	

Как видно из таблицы, креветки с удаленными железами андрогена на стадии 30 дней после метаморфоза имеют меньшую скорость роста по сравнению с креветками на стадиях PL 40 и PL 50. Выживаемость креветок на стадии PL 30 спустя неделю после микрохирургии ниже (46,66 %, n = 7) по сравнению с выживаемостью креветок на PL 40–50, где этот показатель составил 80 % (n = 12).

Скорость роста креветок с удаленными андрогенными железами на стадии PL 50 происходил не намного быстрее, чем у самок и самцов из контрольной группы.

Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом. Самцы на стадии PL 30, согласно размерно-весовой категории, являются маленькими и слабыми особями, поэтому после удаления железы андрогена их рост замедляется, что, в свою очередь, приводит к высокой смертности (53,33 %, n = 8) через неделю после микрохирургии. Спустя 3 мес. после микрохирургии было получено 9 фальшивых самок. У данных псевдосамок не имелось мужских отростков, а половые отверстия расположены на коксах третьей пары.

В данном исследовании мы не пытались подвергнуть проверке способ создания и размножения фальшивых самок, так как в мире уже существует много различных исследований по вопросу получения стада креветок с большим процентом самцов (100 %) из фальшивых самок.

Нами впервые было изучено образование половой системы у креветок с измененным полом в результате удаления андрогенной железы андрогена на разных стадиях. Проведенное исследование позволяет определить стадии, на которых пол креветок изменяется и в результате чего возможно образовывать фальшивых самок. Это закладывает основу разработки новых технологий производства популяции с большим количеством самцов не только у представителей отряда Decapoda (Latreille, 1802), но и у других водных живодных для увеличения доходности и экономического значения.

Список литературы

1. **Бейли И. Н.** Статистические методы в биологии / И. Н. Бейли. – Москва : Иностранная литература, 1962. – 260 с.
2. **Вундцеттель М. Ф.** Общая гидробиология / М. Ф. Вундцеттель. – Астрахань : Астраханский гос. ун-т, 2003. – 153 с.
3. **Волкова О. В.** Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – Москва : Медицина, 1982. – 303 с.
4. **Сальников Н. Е.** Биология и культивирование пресноводных креветок / Н. Е. Сальников, М. Э. Суханова. – Астрахань : Астраханский гос. тех. ун-т, 1998. – 86 с.
5. **Aflalo E. D.** A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* / E. D. Aflalo, T. T. T. Hoang, V. H. Nguyen, Q. Lam, D. M. Nguyen, Q. S. Trinh, S. Raviv, A. Sagi // *Aquaculture*. – 2006. – № 256 – P. 468–478.
6. **Sagi A.** The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a biotechnological perspective / A. Sagi, E. D. Aflalo // *Aquac. Res.* – 2005. – № 36. – P. 231–237.
7. **Sagi A.** Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex population: yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages / A. Sagi, Z. Ranan, D. Cohen, Y. Wax // *Aquaculture*. – 1986. – № 51. – P. 265–275.
8. **Sagi A.** Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males / A. Sagi, D. Cohen // *World Aquac.* – 1990. – № 21. – P. 87–90.
9. FAO “Fisheries technical”. Farming freshwater prawn’s // Michael B. A manual for the culture of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*. – New Marlow, 2002. – 428 p.

References

1. Bailey I. N. *Statisticheskie metody v biologii* [Statistical methods in Biology]. Moscow, Inostrannaya Literatura, 1962, 260 p. (in Rus.)
2. Vundtsett M. F. *Obshchaya gidrobiologiya* [General Hydrobiology]. Astrakhan, Publ. Astrakhan State University, 2003, 153 p. (in Rus.)
3. Volkova O. V., Yeletsky J. K. *Osnovy gistologii s gistologicheskoy tekhnikoy* [Fundamentals of Histology with histological techniques]. Moscow, Meditsina, 1982, 303 p. (in Rus.)
4. Calinicob N. E., Sukhanova M. E. *Biologiya i kultivirovanie presnovodnykh krevetok* [Biology and cultivation of freshwater shrimp]. Astrakhan, Publ. Astrakhan State Technical University, 1998, 86 p. (in Rus.)
5. Aflalo E. D., Hoang T. T. T., Nguyen V. H., Lam Q., Nguyen D. M., Trinh Q. S., Raviv S., Sagi A. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2006, no. 256, pp. 468–478.
6. Sagi A., Aflalo E. D. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a biotechnological perspective. *Aquac. Res.*, 2005, no. 36, pp. 231–237.
7. Sagi A., Ranan Z., Cohen D., Wax, Y. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex population: yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. *Aquaculture*, 1986, no. 51, pp. 265–275.
8. Sagi A., Cohen D. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquac.*, 1990, no. 21, pp. 87–90.
9. FAO “Fisheries technical”. Farming freshwater prawn’s. *Michael B. A manual for the culture of the giant river prawn Macrobrachium rosenbergii*. New Marlow, United Kingdom, 2002, 428 p.