

8. Иванов А.И. Некоторые итоги и задачи разработки биотехнологии выращивания мидий в Черном море. В сб.: Моллюски: результаты и перспективы их исследований. Л.: Наука, 1986. С. 465-466.
9. Крючков В. Г. Создание хозяйств марикультуры в прибрежных акваториях Чёрного моря. Основные результаты комплексных исследований в Азово-черноморском бассейне и Мировом океане, 2011. Т. 49. С. 72-77.
10. Крючков В.Г. Себестоимость выращивания мидий в современных условиях. Рыбн. хоз-во Украины, 2011. № 5. С. 62-66.
11. Панов Б.Н. Океанографические предпосылки размещения аквахозяйств в Черном море. Тр. ВНИРО "Рыбохозяйственные исследования в Азово-Черноморском бассейне". М.: ВНИРО, 1987. С. 4-12.
12. Скарлато О.А. Старобогатов Я.И. Класс двустворчатые моллюски – *Bivalvia*. Определитель фауны Черного и Азовского морей. К.: Наука, 1972. Т. 3. С. 178-249.
13. Троценко Б. Г. Солодовников А.А. Проблемы и перспективы развития аквакультуры в Крыму. Рыбн. хоз-во Украины, 2006. № 5/6. С. 41-46.
14. Шурова Н.М. Структурно-функциональная организация популяции мидий *Mytilus galloprovincialis* Черного моря: дис. докт. биол. наук: 03.00.17. Севастополь, 2009. 379 с.

УДК 639.3.03

Булли Л.И.¹, Булли А.Ф.², Куликова Н.И.³

1 – канд. биол. наук, доцент кафедры водные биоресурсы и марикультура ФГБОУ ВО «КГМТУ», 2 – старший преподаватель кафедры водные биоресурсы и марикультура ФГБОУ ВО «КГМТУ», 3 – зав. лаб. физиологии рыб ЮгНИРО (ныне – Керченский филиал «ЮгНИРО» ФГБНУ «АзНИИРХ»)

К РАЗРАБОТКЕ МЕТОДОВ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГОНАДАХ САМОК ПИЛЕНГАСА (*LIZA NAEMATOSCHEILUS* TEMMINCK & SCHLEGEL, 1845) ПРИ ВЫДЕРЖИВАНИИ В НЕРЕСТОВЫХ УСЛОВИЯХ

Аннотация. В работе показана возможность использования для целей воспроизводства производителей кефали пиленгаса с завершенной и незавершенной IV стадией зрелости гонад, резервируемых при нерестовых условиях. Гормональная обработка малыми дозами суспензии ацетонированных гипофизов сазана (0,7-1 мг/мл) в ходе выдерживания рыб с дефинитивными ооцитами способствует предотвращению дегенеративных изменений в их гонадах и получению качественных зрелых половых продуктов. Установлено, что самки пиленгаса, не достигшие преднерестового состояния (IV незавершенная стадия зрелости), дозревают в течение 11-20-суточной резервации при нерестовой температуре, близкой к нижнему порогу

– 17-18°, и ежедневном введении малых доз гормона. У них нормально проходят завершающие этапы трофоплазматического роста ооцитов, яйцеклетки достигают дефинитивного состояния и после гипофизарной стимуляции созревания от таких рыб можно получить икру высокого рыбоводного качества. Это позволяет увеличить сроки нерестовой кампании.

Ключевые слова: воспроизводство, пиленгас, гипофизы, гонады, дегенеративные изменения, резервация

Abstract. In the paper, the possibility is shown to use so-iuy mullet breeders with gonads at stage IV (completed and incompleting), obtained in spawning conditions, for reproductive purposes. The hormone processing with small doses of suspended mixture of the acetated European carp pituitary gland (0.7-1 mg/ml) while rearing makes it possible to prevent degenerative changes in their gonads and to obtain reproductive products of high quality.

Keywords: reproduction, *Liza haematocheilus*, so-iuy mullet, gonads, pituitary gland, degenerative changes, reservation area.

При проведении работ по искусственному воспроизводству кефалей зрелые половые продукты получают с помощью гормонального метода стимулирования созревания. Для этих целей отбирают рыб с дефинитивными размерами яйцеклеток, в то же время, производителей с незавершенной IV стадией зрелости гонад, как правило, выбраковывают. В результате, нерестовая кампания проводится в один тур и в довольно сжатые сроки.

Для расширения периода работ на питомниках по получению зрелых половых продуктов кефалей, и более рационального использования рыбоводного оборудования необходимы эффективные методы резервации производителей. Такие методы позволят обеспечивать длительное сохранение чувствительности к гормональным препаратам рыб с дефинитивными ооцитами, а также получать качественную зрелую икру от производителей с разной степенью зрелости гонад (в частности, с IV завершенной и незавершенной стадией зрелости).

С проблемой необходимости разработки методов, направленных на предотвращение дегенеративных изменений в яичниках кефалей мы столкнулись при разработке биологических основ и биотехники искусственного воспроизводства кефалей. Обращало на себя внимание то, что при повышении температуры до верхнего порога нерестовой – 23 °С, чувствительность рыб к гормонам гипофиза резко падает, процессы трофоплазматического роста

ооцитов тормозятся, а при температуре 24-25 °С быстро (в течение 3-4 суток) появляются признаки резорбции желтковых ооцитов, которые в дальнейшем усиливаются, наступает дегенерация ооцитов всех фаз развития [1]. Необратимые изменения в половых клетках наступают уже через несколько дней выдерживания рыб не только при высокой температуре, но и при нерестовой, а также при резком ее снижении до 10-12 °С, например, при сгонных явлениях в Черном море. Это приводит к быстрой потере чувствительности гонад к гормонам и ухудшению качества зрелых половых продуктов.

Цель исследования. Разработка способа предотвращения дегенеративных изменений в гонадах самок кефалей в ходе резервации при нерестовых условиях.

В настоящей работе приведены результаты экспериментов, полученных в ходе работ с производителями пиленгаса *Liza haematocheilus* Temminck & Schlegel, 1845.

Материал и методы. Работы выполнены на рыбах маточного стада пиленгаса (1989, 1990 гг.), содержащихся в условиях северо-западного Причерноморья, и естественных популяций (1996-2007 гг.), отобранных из уловов кефалевого подъемного завода, установленного в Керченском проливе в районе с. Заветное в период их миграции на нерест в Черное море.

Производителей с незавершенной и завершенной IV стадии зрелости гонад резервировали при различных комбинациях температуры и солености, в диапазонах от 14 до 24°С и от 3-3,5 до 20-22 ‰. Рыб содержали либо в проточных пластиковых или железобетонных бассейнах, объемом 3-6 м³ и 80-100 м³, либо в рециркуляционных установках для производителей конструкции ЮгНИРО. Длительность резервации составляла от 5 до 20 суток.

Созревание рыб стимулировали в день начала экспериментов и через различные сроки резервации ацетонированными гипофизами сазана (АГС). Схемы введения гормонов и контроль за созреванием рыб вели по разработанным методам [2]. Для сохранения нормального физиологического

состояния производителей и предотвращения резорбции их ооцитов во время резервации использовали инъекции малых доз гипофизов сазана - 0,7-1 мг/кг с интервалом в 48 час.

Резервированным самкам пиленгаса с незавершенной IV стадией зрелости гонад малые дозы гипофизов вводили ежедневно. По окончании резервации, при появлении в гонадах ооцитов дефинитивного состояния, опытных рыб инъецировали для стимулирования их созревания по обычной методике [2].

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты, полученные в ходе исследований, свидетельствуют, что соленость среды является фактором, определяющим нормальное протекание вителлогенеза в период преднерестового выдерживания рыб. Резервация в течение 20 суток преднерестовых самок пиленгаса в воде низкой солености 3-3,5 ‰ (температура 14-19 °С) приводит к глубоким негативным изменениям в гонадах значительного числа рыб – до 88%. При гормональной обработке производителей из этой серии опыта доброкачественную икру получить не удавалось. Длительная резервация преднерестовых самок пиленгаса в морской воде при температуре 16-20 °С также вызывает резорбцию гонад почти у половины рыб, но часть их (38 %) сохраняет способность отвечать на гормональную обработку созреванием зрелых яйцеклеток (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние условий резервации преднерестовых самок пиленгаса на эффективность гормональных обработок (период резервации 20 суток)

Условия резервации		Число рыб с резорбцией гонад, %	Результаты гормональной обработки, %		
Т, °С	S, ‰		t = 20 °С, S = 17 ‰		
			Созревание, овуляция	Вымет мертвой икры	Резорбция в ходе обработки
16-20	14-15	53	38	19	43
14-19	3-3,5	88	0	13	87

В работах ряда авторов показано, что повреждение половых клеток связано с торможением выведения гонадотропинов и нарушением их нормального функционирования [3, 4 и др.]. В опытах выполненных *in vitro* и *in vivo* на осетровых рыбах было установлено, что реактивность клеток фолликулярного эпителия подавляется раньше, чем самого ооцита [5, 6]. Таким образом, на фоне снижения уровня гонадотропинов в крови на начальных этапах резорбции ооцитов нарушается одна из важнейших функций гонад – синтез половых стероидных гормонов, которые наряду с гормонами гипофиза, играют важную роль в осуществлении нормального процесса размножения у рыб.

У костистых рыб также выявлена тесная связь между морфологическими изменениями в гонадотропоцитах и стероидсинтезирующих клетках, соответственно, и между уровнем гонадотропных и стероидных гормонов [7]. В процессе роста и созревания половых желез повышение уровня половых стероидов в крови идет параллельно с увеличением гонадотропинов. В период посленерестовой резорбции гонад уровень половых стероидных гормонов у рыб резко снижается [8, 9]. Падает он также и при резервации производителей. И.А. Баранниковой с соавторами [10] показано, в частности, что самки севрюги вскоре после вылова из реки имеют достоверно более высокое содержание эстрадиола в крови, чем рыбы после резервации в прудах.

Для предотвращения атрезии яйцеклеток у резервируемых рыб рядом авторов предпринимались попытки восстанавливать утраченную фолликулами чувствительность к гормонам введением некоторых препаратов. Так, Т.Д. Детлаф и С.И. Давыдова [11] при работах с севрюгой использовали трийодтиронин, Шехадех с соавторами [12] – многократные инъекции хорионического гонадотропина (ХГ) для предотвращения резорбции желтковых ооцитов лобана, Б.Г. Травкин [13] и Смит [14] – эстрадиола, И.А. Баранникова [15] получала хорошие результаты при инъектировании кубанской севрюге малой дозы гипофизов (1/7 эффективной дозы).

Учитывая опыт отечественных и зарубежных исследователей, для предотвращения дегенеративных изменений у резервируемых самок пиленгаса мы использовали инъекции малых доз (0,7-1 мг/кг) ацетонированного гипофиза сазана. Результаты одного из таких экспериментов приведены в табл. 2. Как следует из представленных в таблице данных, гормональная поддержка в ходе резервации рыб с дефинитивными размерами ооцитов способствовала сохранению их нормального физиологического состояния и предотвращению дегенеративных изменений в гонадах.

Таблица 2 – Сравнительные данные о реакции на гипофизарные инъекции интактных и резервированных при нерестовой температуре самок пиленгаса (длительность резервации – 5 суток, $t = 20-22^{\circ}\text{C}$, $S = 17 \text{ ‰}$)

Вариант опыта	Исходный диаметр ооцитов	Эффективная доза АГС, мг/кг	Время созревания, час	Конечный результат	Оплодотворение, %
Контроль (стимулирование созревания через 12 ч после отбора из садков)	664,9	6,7	49	Полная овуляция	63
	641,2	6,6	52	Частичная овуляция	50
	608,1	12,4	71	Гибель клеток до овуляции	-
	657,0	6,0	41	Полная овуляция	85
Опыт 1 Резервация без гормональной обработки	674,9	7,0	50	Полная овуляция	80
	619,7	7,3	47	Слияние жировых капель	-
	634,0	6,8	49	Мертвая икра	-
	629,5	6,3	45	Задержка овуляции	-
Опыт 2 Введение в ходе резервации двух доз АГС по 0,7 мг/кг с интервалом в двое суток	649,2	6,6	48	Полная овуляция	66
	620,6	6,6	50	Полная овуляция	64
	618,1	8,7	68	Частичная овуляция	50
	619,4	7,65	59	Частичная овуляция	59
	634,8	6,0	38	Полная овуляция	70

Используемый режим гормональной обработки резервируемых рыб (опыт 2) позволил более эффективно использовать производителей пиленгаса для искусственного воспроизводства и получить икру хорошего рыбоводного качества. В то же время, при резервации в сходных условиях без гормональной поддержки (опыт 1) зрелую икру получить не удалось.

Резорбция яйцеклеток у рыб наступает довольно быстро как в заводских, так и в природных условиях, когда во время нерестового сезона отсутствует комплекс факторов для перехода рыб в нерестовое состояние [15, 16]. Первыми повреждаются ооциты, закончившие трофоплазматический рост, т.е. дефинитивные. Процесс дегенерации начинается асинхронно, так что у одной самки можно обнаружить неповрежденные ооциты и ооциты разных фаз резорбции, а после гипофизарной инъекции одновременно и независимо друг от друга протекающие процессы как нормального созревания, так и дегенерации [16]. Качество получаемой икры при этом заметно снижается.

У более зрелых рыб с гонадами на завершенной IV стадии зрелости, выдерживаемых при нерестовой температуре близкой к верхнему пределу, дегенеративные изменения наступают быстрее. При этом в первые сутки резервации снижается чувствительность рыб к гормонам гипофиза, и они могут реагировать созреванием и овуляцией при введении более высокой дозы гипофизарного материала. У большинства самок процесс не идет дальше слияния жировых включений и перехода в фазу гомогенизации желтка. Дальнейшее выдерживание при нерестовой температуре обуславливает появление дегенеративных изменений в ооцитах: тургор их снижается, оболочки разрушаются и отслаиваются. Некоторые рыбы после введения гормонов гипофизов выметывают мертвую икру.

При резервации рыб с незавершенной четвертой стадией зрелости, диаметром ооцитов 530-590 мкм (табл. 3, опыт 1), поддерживающие малые дозы гормонов вводились ежедневно до достижения ооцитами дефинитивного размера. Затем опытных рыб инъекцировали для стимулирования их созревания.

В ходе выполненных работ было установлено, что самки пиленгаса, не достигшие преднерестового состояния (IV незавершенная стадия зрелости), при нерестовой температуре, особенно близкой к нижнему порогу – 17-18 °С довольно быстро дозревают при введении малых доз гормона.

У них нормально проходят завершающие этапы трофоплазматического

роста ооцитов, яйцеклетки достигают дефинитивного состояния, чувствительность их к гормонам гипофиза увеличивается, и после гипофизарной стимуляции созревания от таких рыб можно получить икру высокого рыбоводного качества. Как свидетельствуют результаты экспериментов (табл 3, опыт 1), эффективная доза гормона при инъектировании созревания рыб в ряде случаев существенно ниже, чем в предыдущих опытах (табл.2). Кроме того, созревание рыб удалось задержать на 11-15 суток.

Таблица 3 – Реакция на гипофизарные инъекции резервированных при нерестовой температуре самок пиленгаса с незавершенной IV стадией зрелости ооцитов (продолжительность резервации 12-22 суток, t = 17-22 °С, S = 16-20 ‰)

Вариант опыта	Исходный диаметр ооцитов	Результаты стимулирования созревания				Время в опыте, сут.
		Эффективная доза АГС, мг/кг	Время созревания, час	Конечный результат	Оплодотворение, %	
<u>Опыт 1.</u> Введение в ходе резервации АГС по 0,7-1 мг/кг через сутки	590,6	3,4	73	Полная овуляция	95	12
	559,4	3,1	75	Полная овуляция	95	12
	551,1	11	86	Полная овуляция	91	15
	516,2	-	-	Погибла при созр.	-	13
	532,3	20	-	Мертвая икра	ед	29
	538,0	3,3	52,5	Полная овуляция	59	11
	530,4	6	50	Резорбция	-	19
<u>Опыт 2.</u> То же, с предварительным выдерживанием в течение 22 суток в воде 16 ‰ (на протоке)	485,6	11,7	56	Полная овуляция	63	34
	506,0	10,6	44	Полная овуляция	75	32
	549	9,9	-	Резорбция	-	5

При работе с рыбами, имевшими гонады III-IV стадия зрелости (табл. 3, опыт 2), с более мелкими ооцитами – 430-470 мкм, их выдерживание осуществляли в течение 22 суток в воде соленостью 16 ‰, при нерестовой температуре. Затем производителей с ооцитами, достигшими размеров более 480 мкм, переносили в рециркуляционную систему в соленость 20 ‰ для резервации с введением поддерживающих доз гормона. В результате экспериментов,

проведенных в рамках этого опыта, созревание рыб удалось задержать на 22-25 суток, что позволило провести второй тур нереста и существенно увеличить продолжительность нерестовой кампании.

Таким образом, в ходе исследований показана возможность использования резервированных производителей кефали пиленгаса в рыбоводном процессе. Выдерживание преднерестовых самок в диапазоне температуры 17-22 °С и солености 16-20 ‰ при гормональной поддержке позволяет длительно сохранять физиологическое качество половых клеток и их чувствительности к гормонам, что обеспечивает получение качественной зрелой икры.

В перспективе при правильной организации резервации рыб, находящихся в преднерестовом состоянии, открываются возможности решения таких важных проблем рыбоводства, как повышение сезонной рабочей плодовитости, ускорение или замедление созревания и расширения тем самым сроков проведения нерестовой кампании, а в перспективе и получение круглогодичного нереста объектов культивирования.

Список использованной литературы:

1. Куликова Н.И. Роль температуры и солености в регуляции отдельных этапов оогенеза у кефали пиленгаса *Mugil (Liza) soiuu* Basilewsky, акклиматизированной в Азово-черноморском бассейне / Н.И. Куликова // VIII научная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. – Петрозаводск, 1992. – С. 178-179.
2. Биотехника искусственного воспроизводства кефалей (лобана, сингиля, пиленгаса) с описанием схемы типового рыбопитомника. [составители: Куликова Н.И., Шекк П.В.] – Керчь: Издательский центр ЮгНИРО, 1996. – 27 с.
3. Статова М.П. Состояние аденогипофиза растительноядных рыб до и после гипофизарных инъекций / М.П. Статова // Вопросы ихтиологии, 1974, т. 14, в. 2, С. 273-282.
4. Фалеева Т.И. Локализация клеток, вырабатывающих гонадотропный гормон, в гипофизе ерша *Aserina setuа* (L) и изменения их в норме и при нарушениях условий размножения / Т.И. Фалеева // В сб.: Гормональная регуляция полового цикла рыб в связи с задачами воспроизводства рыбных запасов. Часть 1, 1975. – М. Пищевая пром-сть. – С. 97-105.
5. Детлаф Т.А. Влияние температуры среды в период согревания ооцитов и овуляции на рыбоводное качество икры осетровых рыб (К вопросу о температурном режиме выдерживания производителей в период получения икры) / Т.А. Детлаф // Труды ЦНИОРХ,

1970. – Т. 2. – С. 112-126.

6. Давыдова С.И. Влияние температуры и времени выдерживания самок на процесс созревания ооцитов осетровых рыб под влиянием гормонов *in vitro* / С.И. Давыдова // Онтогенез, 1972. – Т. 3, № 4. – С. 415-420.

7. Арбузова Л.Л. Цитологические основы влияния гонадотропинов на половые и стероидсинтезирующие клетки костистых рыб / Л.Л. Арбузова, А.А. Максимович // Владивосток, изд-во ДВО АН СССР, 1989. – 30. – 1 с.

8. Ложичевская Т.В. Динамика биохимических показателей тканей самок осетра в процессе резорбции ооцитов / Т.В. Ложичевская, Г.Г. Корниенко, Л. Г. Баландина // Тезисы докл. УШ научн. конф. по экологической физиол. и биохимии рыб. – Петрозаводск, 1992. – т.1. – С. 186-187.

9. Sen P.R. Estrogenic Hormones in the ovaries of major carp *Labeo rohita* during the different stages of Wturity / P.R Sen., S.C Banerjee // J. Inland Fish.Soc. India, 1977. – М. 8. – Pp.72-76.

10. Баранникова И.А. Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови себрюги *Acipenser stellatus* в начале анадромной миграции в Волгу и при созревании после гормональных воздействий / И.А Баранникова, А.А. Боев, Л.В Баюнова, В.П. Дюбин, И.И. Саенко // Вопросы ихтиологии, 1999, т. 39, № 1. – С. 111-116.

11. Детлаф Т.А. Влияние трийодтиронина на созревание ооцитов себрюги после действия низких температур и резервации самок / Т.А. Детлаф, С.И. Давыдова // Онтогенез, №5, 1974. – С. 454-461.

12. Shehadeh Z.H., Madden W.D., Dohe T.P. The effect of exogenous hormone treatment on spermiation and vitellogenesis in the grey mullet (*Mugil cephalus* L.) / Z.H Shehadeh., W.D. Madden., T.P. Dohe // I. Fish. Biol., 1972. – V. 5. – Pp. 479-487.

13. Травкин Б.Г. Влияние эстрадиол-бензоата на половые железы плотвы (*Rutilus rutilus* L.) / Б. Г. Травкин // Сборник научных трудов НИИ озёрного и речного рыбного хозяйства, 1982, № 179. – С. 108-114.

14. Smith C.I. Steroid profiles of the female tilapia *Oreochromis mossambicus* and correlation with oocytes growth and mouthbrooding behavior / C.I. Smith // Gen. and Compar. Endocrin. 1988. – М. 69, № 1. – Pp. 88-98.

15. Баранникова И.А. Гормональная регуляция размножения у осетровых / И.А. Баранникова // В сб.: Гормональная регуляция полового цикла рыб в связи с задачами воспроизводства рыбных запасов. Часть II. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – С. 6-16.

16. Фалеева Т.И. Биологическое значение и функциональный механизм атрезии овариальных фолликулов у рыб / Т.И. Фалеева // В кн.: Обмен веществ и биохимия рыб, 1967. – М., Наука. – С. 59-64.