

УДК 597.423:591.37

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ПОДТВЕРЖДЕНИЕ
ФЕРТИЛЬНОСТИ САМЦОВ
МЕЖРОДОВОГО ГИБРИДА (F1)
СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER
RUTHENUS*)
И КАЛУГИ (*HUSO DAURICUS*)**

*Е.И. Рачек, В.Г. Свирский, В.И. Скирин,
Д.Е. Липин*

Тихоокеанский научно-исследовательский
рыбохозяйственный центр
Россия, г. Владивосток, 690091,
rachek@tinro.ru

Эффективность культивирования товарных осетровых рыб во многом зависит от продуктивности видов и пород производителей. Несомненно, что в будущем, подобно карповодству и лососеводству, появятся районированные породы осетровых рыб, адаптированные к местным условиям, содержанию в технических сооружениях при высоких плотностях посадки, эффективно утилизирующие искусственные корма, обладающие высокими потенциями роста и повышенной плодовитостью. Наиболее приемлемы для проведения работ по созданию новых пород индустриальные тепловодные хозяйства и УЗВ.

При доместикации, селекции и гибридизации осетровых рыб из природных популяций с целью создания новых пород немаловажное значение имеет уровень ploидности культивируемых видов. Известно, что виды с одинаковым уровнем ploидности при скрещивании дают плодовитые формы. Примером могут служить «бестеры», полученные при гибридизации белуги и стерляди. Селекция «бестеров» привела к созданию трех пород, отличающихся темпом роста, количеством получаемой икры и сроками созревания (Бурцев, 1983; Бурцев и др., 2002).

Однако потомство от производителей осетровых с различным

уровнем ploидности обычно оказывается стерильным, хотя часть самцов может созревать как, например, гибрид стерляди с осетром (Бурцев, 1962).

Интродукция личинок стерляди (1992 г.) и личинок калуги (1996 г.) в тепловодное рыбоводное хозяйство ТИНРО-Центра (п. Лучегорск, Приморского края) была осуществлена с целью создания в обозримом будущем групп гибридных производителей – дальневосточных аналогов бестера. Предполагалось, что они окажутся не менее перспективными, чем гибридные формы белуги со стерлядью (Свирский, Рачек 2000). Существующие к началу XXI века работы по ploидности осетровых рыб характеризовали калугу и стерлядь как диплоидные виды со 120-ю хромосомами. Для калуги это подтверждалось как прямым подсчетом хромосом, так и путём определения в клетках количества суммарной ДНК, соответствующей определённому типу ploидности (Burtzev et al., 1976; Birstein et al., 1993; Ludwig et al., 2001).

При созревании первых самцов калуги в 2005 г. на Лучегорской научно-исследовательской станции (НИС) ТИНРО-Центра была получена гибридная форма «стерлядь × калуга». В 2006 г. при созревании первых самок калуги получена гибридная форма «калуга × стерлядь». В течение 5 лет производилось ежегодное получение реципрокных гибридов калуги со стерлядью (Ст × К и К × Ст) от различных производителей. Высокий уровень оплодотворения икры (до 95%) и значительный процент выхода личинок (60–75%) свидетельствовали о высоком уровне совместимости геномов обоих видов (Рачек, Свирский, 2010). По темпу роста и эффективности использования корма в садках гибриды приближались к калуге, вырастая до 5 кг в возрасте 3+ при средних кормовых затратах 2,5-3,0 кг/кг прироста. С этого возраста часть особей отбиралась в ремонтные группы.

Осенью 2009 г. при технологической переработке товарных



особей гибридной формы «стерлядь × калуга» в возрасте 3+ была проведена оценка состояния их половых желез посредством вскрытий. Достоверно выявлены половые различия самцов и самок гибридов. Среди исследованных особей оказалось 40% самок на II стадии зрелости и 60% самцов с семенниками на II, II-III и III стадиях зрелости (Рачек и др., 2009).

На гистологических препаратах отмечались интенсивные процессы сперматогенеза и спермиогенеза. При просмотре достаточно большого количества препаратов семенников гибридных форм стерляди с калугой (38 экз.) выявилась довольно пёстрая картина состояния половых желез. Семенные каналцы некоторых особей были заполнены сформированными спермиями. У большинства особей в семенниках наблюдался активный спермиогенез. Вместе с тем, существовали особи, в

семенниках которых наблюдались процессы резорбции семенной ткани вплоть до замещения её жировой тканью. Нарушений гаметогенеза у самок не отмечено.

При осенней бонитировке ремонтного стада гибридов Ст × К в возрасте 4+ посредством шуповых проб выявлены первые самцы с семенниками на III и III-IV стадиях зрелости. У некоторых самцов отмечено покраснение полового отверстия.

Весной 2010 г. у нескольких десятков самцов гибридов Ст × К проявилась брачная окраска – на крыше черепа образовался белый налёт, характерный для созревающих производителей стерляди, но полностью отсутствующий у производителей калуги. Были предприняты две попытки получения спермы от самцов с наиболее интенсивной окраской головы (рис. 1).



Рис. 1. Окраска головы у зрелого самца гибрида «стерлядь x калуга»

Результаты исследований

Получение спермы от самцов гибрида Ст × К, осеменение и инкубация икры возвратных гибридов

Опыт № 1. При проведении нерестовой компании 16 мая 2010 г. трём самцам гибридной формы «стерлядь × калуга» в возрасте 5 лет массой 8,0–10,2 кг были сделаны однократные инъекции сурфагона из расчёта 2,5 мкг/кг массы тела. Через 22 часа 17 мая 2010 г. от всех самцов получили по 100-170 мл спермы. Она представляла собой пенистую почти прозрачную жидкость желтоватого оттенка. Концентрация спермиев в одной из проб при подсчёте с использованием камеры Горяева составила 57 тыс. шт./мм³. Определение качества спермы по 5-балльной шкале (Казаков, 1978) позволило оценить подвижность спермы в 4 балла. Подвижность спермы сохранялась в течение 3-х суток после хранения в холодильнике. На тотальных препаратах (мазки спермы) видимых нарушений спермиев не обнаружено.

Для возвратного скрещивания 17 мая 2010 г. использовали 85 г (10600 шт.) овулировавших икринок массой 8 мг от самки стерляди волжской популяции в возрасте 12 лет. Икру осеменяли смесью всей полученной спермы от 3-х самцов гибрида Ст × К с добавлением 1 литра воды. Обесклеивание проводили суспензией белой глины в течение одного часа. Икру гибрида Ст × (Ст × К) инкубировали в аппарате «Осётр» при температуре 17,4–21,1°C. Оплодотворяемость икры на стадии 4 бластомеров составила 92%. Вылупление предличинки началось 21 мая на 4-е сутки инкубации и закончилось 22 мая. Всего вылупилось 5146 личинок, или 48,5% от заложенной икры. Температура при выдерживании варьировала от 22,5 до 24,4°C. Предличинки начали роиться на 4 сутки выдерживания, личинки гибридов Ст × (Ст × К) перешли на активное питание на 7-е сутки выдерживания. Отход

при переходе на активное питание составил 550 экз., или 10,7 %.

Опыт № 2. Трём самцам гибрида Ст × К в возрасте 5 лет массой 9,8 -10,2 кг с явно выраженным белым налётом на голове 23 мая сделали однократные инъекции сурфагона из расчёта 2,5 мкг/кг массы тела. Через 19 часов от первого самца получили 50 мл спермы цвета молока, от второго 170 мл цвета разбавленного молока, от третьего 150 мл мутновато-белого цвета. Концентрация спермиев в пробе от первого самца составила 4,9 млн.шт./мм³, от второго – 0,56 млн. шт./мм³. Подвижность спермиев от двух первых самцов оценена в 4-5 балла при продолжительности движения 2 мин. 50 сек. Смесью икры от трёх самок калуги в количестве 150 г со средней массой икринки 25 мг (6000 шт.) 24 мая 2010 г. осемили спермой трёх самцов гибридов Ст × К. Для осеменения использовали по 20 мл спермы от каждого самца, 60 мл спермы были разведены в 6 литрах воды. Обесклеивание произвели танином в течение 40 секунд. Инкубация в аппарате «Осётр» происходила при повышенной температуре воды 23,5-24,4°C. На 29-ой стадии развития эмбрионов отмечен повышенный отход. Вылупление предличинки произошло на 3-4-е сутки инкубации икры. Всего вылупилось 1490 предличинки, или 24,8% от заложенной икры. Роение предличинки при температуре воды 23,5°C началось на четвертые сутки выдерживания. К середине дня 2 июня 2010 г. рой начался распадаться. На 8-9-е сутки выдерживания все личинки гибрида К × (Ст × К) перешли на активное питание.

Выращивание молоди и сеголеток возвратных гибридов в бассейнах и садках

Личинок возвратных гибридов Ст × (Ст × К) и К × (Ст × К), полученных в опытах, содержали в двух отдельных прямоточных лотках японского производства площадью 2,4 м² каждый. С начала выдерживания в третьей декаде мая до 19 июня лотки были включены в систему УЗВ, с 20 июня модуль с лотками



перевели на прямоточную систему водоснабжения из подводящего канала электростанции. Температура воды во время выращивания в лотках варьировала от 22,8°C до 32,6°C, составив в среднем 27,3°C. Содержание кислорода изменялось от 7,2 мг/л (94 % насыщения) в начале опыта до 4,9-5,5 мг/л (68-77% насыщения) в конце опыта при переводе молоди в садки. В первые недели опыта основу рациона личинок и молоди составляли живые науплии артемии, трубочник и модифицированный осетровый стартовый корм Ст-07М различных фракций. Затем молодь получала только корм Ст-07М и влажные гранулы на основе его отсева с добавлением 20-25% фарша из мелкой свежей малоценной рыбы.

С 4 августа 2010 г. молодь гибридов перевели в стандартные садки площадью 10 м² с глубиной 1,5 м, установленные на типовой понтонной линии ЛМ-4, закрепленной в водоподводящем канале Приморской ГРЭС. Рацион осетров был представлен гранулами рецепта 12-80М с содержанием протеина 42-44% и влажными гранулами на основе корма рецепта Ст-07М и рыбного фарша с добавлением 3% растительного масла и витамина Е. Температура в период опыта варьировала от 25,8°C до 9,8°C. Результаты опыта представлены ниже (табл. 1).

Как видно из полученных результатов, большей массы тела, длины и обхвата достигли гибриды К × (Ст × К), имеющие 2/3 генов калуги (табл. 1, 2).

Таблица 1

Результаты выращивания гибридов в лотках и садках

Гибридная форма	Выращивание в лотках (04.06.10–04.08.10)			Выращивание в садках (05.08.10–21.10.10)		
	Начальная масса, г	Конечная масса, г	Выживаемость, %	Начальная масса, г	Конечная масса, г	Выживаемость, %
Ст × (Ст × К)	0,044	27,4	7,64	27,4	139,7	97,2
К × (Ст × К)	0,058	28,9	8,38	28,9	152,8	95,2

Таблица 2

Результаты бонитировки сеголеток возвратных гибридов Ст × (Ст × К) и К × (Ст × К) (21.10.2010 г.)

Показатели	Гибридные формы					
	Ст × (Ст × К)			К × (Ст × К)		
	М±m	Lim	Cv, %	М±m	Lim	Cv, %
Масса, г	139,7±11,7	40–310	46,0	152,8±13,1	45–295	47,0
Длина АС, см	26,6±0,76	16,3–33,7	15,7	27,5±0,91	18,2–35,6	18,0
Обхват, см	11,8±0,39	7,2–16,1	18,0	12,6±0,43	8,6–17,1	18,6
Коэффициент упитанности	0,79±0,03	0,57–1,22	19,6	0,78±0,02	0,61–1,08	13,8
Коэффициент массонакопления	0,102			0,105		

Осетровое хозяйство



Рис.2. Сеголеток гибрида «стерлядь × (стерлядь × калуга)»



Рис.3. Сеголеток гибрида «калуга × (стерлядь × калуга)»

Осетровое хозяйство

Превышение по массе над гибридами Ст × (Ст × К) составило 9,4%. Масса, длина и обхват гибридов К × (Ст × К) оказались более изменчивыми, чем аналогичные показатели у гибридов Ст × (Ст × К), коэффициент упитанности несколько ниже и менее вариабелен. По форме тела гибриды Ст × (Ст × К)

напоминают стерлядь, а гибриды К × (Ст × К) – калугу (рис. 2, 3). Гибриды Ст × (Ст × К) имеют заостренную форму рыла и небольшой рот, усики не достают до верхней губы. Форма рта гибрида К × (Ст × К) близка к калужьему, рыло более короткое треугольной формы, усики достают до рта (рис. 4).



Рис.4. Форма рыла и рта у сеголеток гибрида «стерлядь × (стерлядь × калуга)», справа, и сеголеток гибрида «калуга × (стерлядь × калуга)», слева

Обсуждение результатов

В период проведения наших работ были опубликованы статьи, в которых приведены новые данные по плоидности калуги (Vasil'ev et al., 2008; Васильев и др., 2009). Авторы статей определили кариотип калуги как 268 ± 4 хромосомы. Однако эти публикации поставили новый вопрос – почему при измерении количества ДНК на клетку содержание ДНК соответствует 120 хромосомному набору калуги? (Ludvig et al., 2001). Авторы статьи (Васильев, др., 2009) касаются этого вопроса, но ограничиваются фразой: «Несоответствие

количества ДНК и числа хромосом объяснить весьма трудно».

Начиная работы по культивированию гибридных форм стерляди с калугой, мы надеялись получить плодовитые формы гибридов. Однако авторы упомянутых выше публикаций подвергают сомнению целесообразность подобных работ и утверждают, что «гибриды 268-хромосомной калуги и 120-хромосомной стерляди будут стерильными» (Васильев и др., 2009). Тем не менее, мы продолжили наши исследования.



Полученные нами результаты свидетельствуют о фертильности самцов гибридной формы Ст × К. Выводы авторов вышеупомянутых статей, основанные на подсчёте хромосом, в данном случае не подтверждаются экспериментальными данными. В литературных источниках имеются сведения о том, что самцы гибридов с разным уровнем ploидности могут созреть и продуцировать жизнеспособную сперму (Николюкин, 1972; Подушка, 2004). Имеется устное сообщение зав. лабораторией воспроизводства рыб Амуррыбвода С.А. Иванова о созревании самцов гибрида самки амурского осетра с самцом волжской стерляди в условиях рыбоводного хозяйства Амурской ТЭЦ-1 (г. Амурск Хабаровского края). Самцы впервые созрели в возрасте пятигодовиков, затем повторно в возрасте шестигодовиков и продуцировали не менее 100-200 мл спермы хорошего качества.

Уже сам факт созревания гибридных самцов Ст × К даёт нам в руки интересный материал для продолжения работ по гибридизации стерляди и калуги в разных сочетаниях с целью получения гибридных форм и товарного производства гибридных форм с ярко выраженными чертами гетерозиса.

Что касается несоответствия числа хромосом и содержания ДНК в клетках, а также разночтений в определении ploидности калуги, то эти вопросы, несомненно, требуют дальнейших проработок со стороны генетиков.

Литература

Бурцев И.А. 1962. О воспроизводительной способности гибрида осетра со стерлядью. // Доклады АН СССР. – Т.144. – № 6. – С. 1377-1379.

Бурцев И.А. 1983. Гибридизация и селекция осетровых рыб при полноцикловом разведении и одомашнивании // Биологические основы рыбоводства: проблемы генетики и селекции. – Л.: Наука. – С. 102-113.

Бурцев И.А., Николаев А.И., Крылова В.Д., Филиппова О.П., Сафронов А.С. 2002. Первые породы осетровых рыб, созданные на основе межродового гибрида белуги со стерлядью – бестера // Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития. Материалы Международной научно-практической конференции (п. Рыбное, 3-6 сентября 2002 г.). – М.: Изд-во ВНИРО. – С. 146-150.

Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В. 2009. Уровень ploидности калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра *Acipenser micadoi* (Acipenseridae, Pisces). // Доклады Академии Наук. – Т. 426. – № 2. – С. 275-278.

Казаков Р.В. 1978. Определение качества половых продуктов самцов рыб. Методические указания. – Л.: ГосНИОРХ. – 15 с.

Николюкин Н.И. 1972. Отдалённая гибридизация осетровых и костистых рыб (теория и практика). – М.: Пищевая промышленность. – 335 с.

Подушка С.Б. 2004. Стерильны ли «стерильные» гибриды осетровых? // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития. III Международная научно-практическая конференция. Материалы докладов. Астрахань: "Альфа-Аст". – С.202-203.

Рачек Е.И., Свирский В.Г. 2010. Индустриальное рыбоводство в ТИНРО-Центре (2000-2010 гг., или 10 лет спустя) // ТИНРО-85. Итоги десятилетней деятельности. 2000-2010 гг.: Сборник статей. – Владивосток: ТИНРО-Центр. – С. 225-245.

Свирский В.Г., Рачек Е.И. 2000. Исследования в области тепловодного индустриального рыбоводства // ТИНРО – 75 лет (от ТОНС до ТИНРО-Центра). – Владивосток: Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр). – С. 258-273.

Birstein V.J., Poletaeв A.I., Goncharov B.F. 1993. The DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by

Осетровое хозяйство

Flow Cytometry. // Cytometry.– V. 14. – P. 377-383.

Burtzev I.A., Nikoljukin N.I., Serebryakova E.V. 1976. Karyology of Acipenseridae Family in Relation to the Hybridization and Taxonomy Problems. // Ichthyologi. – V. 8. – P. 27 -34.

Vasil'ev V. P., Vasil'eva E. D., Shedko S.V., and Novomodny G. V. 2008. Karyotypes of the Kaluga *Huso dauricus* and Sakhalin

Sturgeon *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces). Materials of the Account Conference on Biodiversity and Dynamics of Gene Pools . – RAS. – Moscow. – P. 19–21.

Ludvig A., Belfiore N.M., Pitra C., Svirsky V. and Jenneckens I. 2001. Genome Duplication Events and Functional Reduction of Ploidy Levels in Sturgeon (*Acipenser, Huso* and *Scaphirhynchus*). // Genetics. – V. 158. – P.1203-1215.