

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА
(ФГУП «ГОСРЫБЦЕНТР»)

Биология, биотехника разведения
и состояние запасов сиговых рыб

BIOLOGY, BIOTECHNOLOGY OF BREEDING AND
CONDITION OF COREGONID FISH STOCKS

Восьмое международное научно-производственное совещание

(Россия, Тюмень, 27-28 ноября 2013 года)

VIII International Scientific and Practical Workshop

(Tyumen, Russia, November, 27-28, 2013)

Материалы совещания

Научное издание

Под общей редакцией
доктора биологических наук А.И. Литвиненко,
доктора биологических наук Ю.С. Решетникова

Тюмень
ФГУП «Госрыбцентр»
2013

СИНХРОНИЗАЦИЯ ОВУЛЯЦИИ У ПЕЛЯДИ (*COREGONUS PELED*) С ПОМОЩЬЮ GnRHa

Коуржил Я.¹, Швингер В.²

¹ Южночешский университет, Факультет рыбоводства и охраны вод,
Южночешский научно-исследовательский центр по аквакультуре и
биоразнообразию гидроценозов, Институт аквакультуры,
г. Ческе-Будейовице, Чешская Республика (kouril@frov.jcu.cz)

² Южночешский университет, Факультет рыбоводства и охраны вод,
Южночешский научно-исследовательский центр по аквакультуре и
биоразнообразию гидроценозов, Научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и гидробиологии, г. Водняны, Чешская Республика

Синтетические GnRHa доказали свою эффективность в индукции овуляции у многих видов лососевых (Crim, Glebe, 1984; Erdahl, McLain, 1987; Breton et al., 1990; Mylonas et al., 1992; Gillet et al., 1996; Olito et al., 2001; Haffray et al., 2005; Mikołajczyk et al., 2008; Noori et al., 2010). Гормональная индукция овуляции у лососевых не требует использования допамин-ингибиторов (Podhorec, Kouřil, 2009). С другой стороны, лососевые требуют гораздо более длительно LH, что может быть достигнуто путем использования препаратов с непрерывным выпуском (Breton et al., 1990; Goren et al., 1995; Zohar, Mylonas, 2001), или путем повторного введения инъекций пептида (Mylonas et al., 1992).

В иммунологии, вспомогательные вещества (адъюванты), используемые для инициирования и увеличения воспалительной реакции необходимы для индукции оптимального врожденного и адаптивного иммунного ответа на вакцины, а также для обеспечения длительного иммунитета (Safari et al., 2011). Адъюванты могут также позволить более низкую дозу и тем самым увеличить активность (Pratanaphon et al., 1997) и снизить стоимость вакцин (Singh, O'Hagan, 1999). В искусственном воспроизводстве лососевых неполный адъювант Фрейнда (FIA) был использован в качестве носителя GnRHa. Такие GnRHa-FIA, как и другие устойчивые формулы использованы у радужной форели (Arabaci et al., 2004; Vazirzadeh et al., 2008) и кеты (Park et al., 2007). Совсем недавно GnRHa-FIA был успешно применен для продвижения и синхронизации овуляции у американской палии (*Salvelinus fontinalis*) (Švinger et al., 2011).

У сига *C. lavaretus*, получены положительные результаты при введении препарата Gonazon (GnRHa aza-gly-nafarelin) в дозе 32 мкг/кг, овулировали 88 % самок через 16 дней после инъекции (Mikołajczyk et al., 2005). О возможностях гормональной стимуляции овуляции пеляди при использовании препарата Supergestran (D-Ala⁶Pro⁹Net]-mGnRHa) с целью ускорения и синхронизации овуляции информировали Kouřil et al. (2010) и Švinger et al. (2010, 2011).

Материал и методы

Работа выполнена на экспериментальной рыбоводной базе Факультета рыбоводства и охраны водной среды в г. Водняны (ЧР). Анестезирующий препарат гвоздичное масло использовали в соответствии с рекомендациями (Kouřil et al., 2010; Микодина и др., 2011) при концентрации 0,03 мл/л. Половозрелые рыбы в возрасте 2+ получены из прудового хозяйства "Кинское рыбоводство" в г. Ждар-над-Сазавоу". После отлова они были перевезены на экспериментальную рыбоводную базу в г. Водняны и посажены в пластмассовые бассейны объемом 800 л с протоком речной воды и ее полным обменом за один час. Температура воды в бассейнах во время исследования постепенно снижалась от 3,0 °C до 0,5 °C, при концентрации кислорода $12,1 \pm 0,8$ мг/л. В три бассейны было посажено по 12 экз. самок (вес 599 ± 73 г/экз.) и в один бассейн – 25 самцов (550 ± 126 г/экз.).

Эксперимент был начат 5-го декабря (приблизительно 2-3 недели перед спонтанной овуляцией), когда самкам из двух экспериментальных групп был внутримышечно введен GnRH α ([D-Arg⁶Pro⁹NEt]-sGnRH α , Bachem AG, Germany), дозы которого составляли 25 мкг/кг, причем в случае второй группы инъекция была введена вместе с FIA (неполный адъювант Фрейнда). В контрольной группе самок гормональные инъекции не проводили, самкам был введен только FIA (0,9 % NaCl + FIA 1:1, 0,5 мл/л). Овулировавшие самки после взвешивания были отцежены. Полученная икра в неактивированном состоянии взвешена, после чего определены псевдогонадосоматический индекс (ПГСИ) - отношение массы сцеженной икры к массе порки в процентах, и масса одной икринки.

Полученные данные анализировали с помощью программы Statistica 9 Cz (StatSoft, Tulsa, USA).

Результаты

Влияние гормональной стимуляции овуляции на диапазон латентного интервала

Первая самка пеляди овулировала на 9-й день после инъекции (из второй группы). Быстрее овулировали самки в 1-ой и 2-ой экспериментальных группах (12-й день после инъекции 25 и 16,7 %, 15-й день 66,7 и 75 %, 18-й день 100 и 91 %). В контрольной группе первая самка пеляди овулировала на 12-й день, 15-й день овулировало 25 %, 18-й день 66,7 %, последняя самка овулировала на 30-й день (рис. 1). В экспериментальных группах опыта овулировали самки в среднем через $15,5 \pm 2,7$ и $15,3 \pm 2,9$ дней после инъекции (разница статистически недостоверная). В контрольной группе самки овулировали в среднем на $19,5 \pm 5,0$ день (разница в сравнении с экспериментальными группами статистически достоверная).

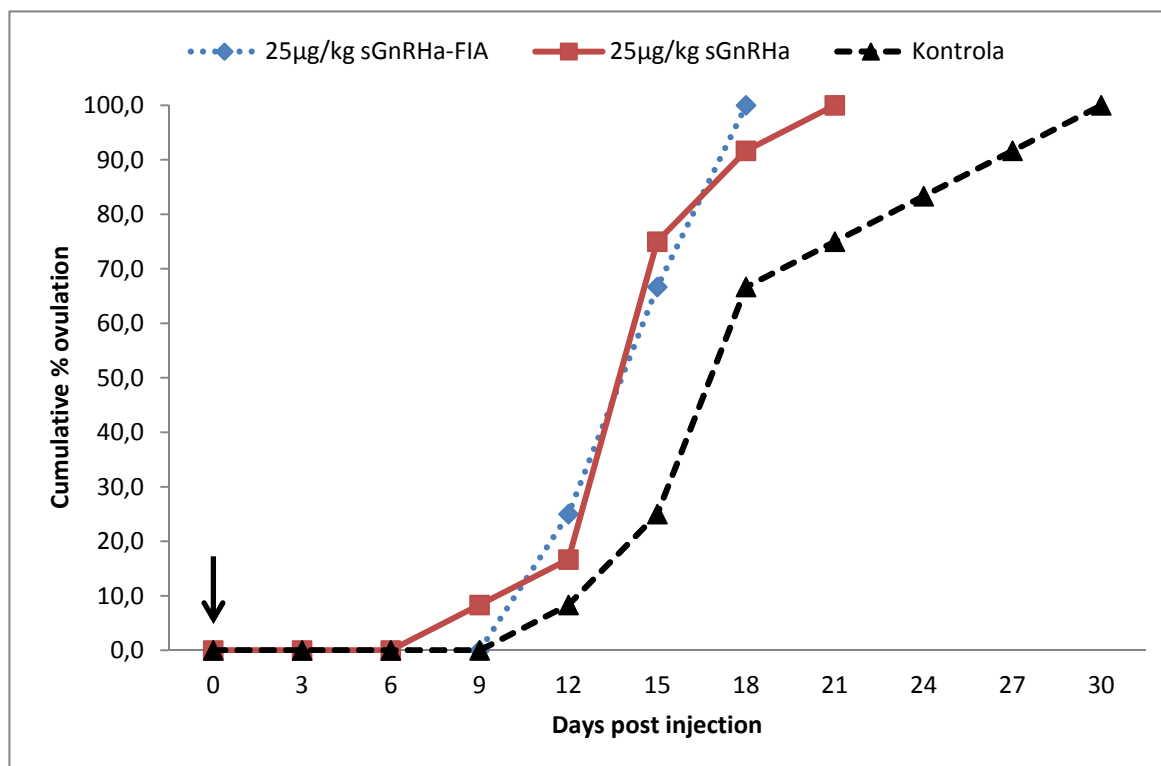


Рисунок 1 - Результаты гормонально стимулированной и спонтанной овуляции пеляди

Влияние гормональной стимуляции овуляции на ПГСИ и размер икринок

Уровень ПГСИ в экспериментальных группах был $15,2 \pm 1,6$ и $13,7 \pm 3,2$ %, у контрольной группы $14,8 \pm 2,4$ % (разница между группами статистически не достоверна). Средний диаметр икринок был у экспериментальных групп $2,026 \pm 0,005$; $2,016 \pm 0,005$ мм и $2,084 \pm 0,005$ мм у контрольной группы (различия между группами статистически недостоверны).

Выживание до стадии глазка и вылупление личинок

Выживаемость до стадии глазка в экспериментальных группах была $44,0 \pm 27,0$ % и $63,2 \pm 15,6$ %, у контрольной группы $62,0 \pm 25,5$ %). Различия между первой экспериментальной группой и другими двумя группами статистически достоверные ($P < 0,01$). Вылупление личинок в экспериментальных группах было $20,2 \pm 13,5$ % и $30,4 \pm 14,4$ %, у контрольной группы $35,3 \pm 24,7$ %). Различия между первой экспериментальной группой и другими двумя группами статистически достоверные ($P < 0,01$), между второй экспериментальной группой и контрольной группой тоже статистически достоверные ($P < 0,05$).

Выживаемость самок пеляди

Никаких существенных различий в посленерестовой смертности самок не было найдено среди всех групп. В промежутке трех месяцев после нерестового периода погибло в экспериментальных группах только по одной самке и в контрольной группе две самки.

Обсуждение

Результаты, полученные нами у пеляди, близки к положительному эффекту, достигнутому ранее у сига *C. lavaretus* при гормональной стимуляции овуляции препаратом Гоназон (Mikolajczyk et al., 2005) и также у пеляди с помощью препарата Супергестран (Kouřil et al., 2010) и Švinger et al. (2010, 2011). Препараты Гоназон и Супергестран содержат разные синтетические GnRHа, и также используемый нами GnRHа был разный. Диапазон латентного интервала у нестимулированных самок был больше, чем у стимулированных.

Идентичный результат в нашем эксперименте с пелядью был получен при использовании неполного адьюванта Фрейнда (FIA) в качестве носителя GnRHа и только самого GnRHа, отдельно от результатов с радужной форелью (Arabaci et al., 2004; Vazirzadeh et al., 2008), кетой (Park et al., 2007) и американской палией (*Salvelinus fontinalis*) (Švinger et al., 2011).

Это исследование показало, что синхронизация овуляции пеляди может быть вызвана использованием одного острого введения [D-Arg6Pro9NEt] sGnRHа в дозе 25 мкг/кг, если близко к естественному времени нереста температура воды снизилась ниже 2 °С. Индукция овуляции синхронизирована sGnRHа, уменьшен размер икринок, выживание до стадия глазка и вылупления личинок. Таким образом, необходимы другие эксперименты для обнаружения причины этих изменений, и чтобы узнать, как возможное сокращение размера икринок может повлиять на дальнейшее выживание мальков.

Работа выполнена в рамках научных проектов GAJU (No. 047/2010/Z) и CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024), финансируемых Правительством Чешской Республики.

Список литературы

Микодина, Е. В. Руководство по применению анестетика „гвоздичное масло“ в аквакультуре / Е. В. Микодина, М. А. Седова, С. В. Пянова, Я. Коуржил, И. Гамачкова. – М. : Изд. ВНИРО, 2011. - 64 с.

Arabaci, M., Diler, I., Sari, M. Induction and synchronization of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHа) and its effects on egg quality. // Aquaculture. - 2004. No. 237. - 475–484.

Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., Zohar, Y. Effects of acute versus sustained administration of GnRH on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. // Aquaculture. - 1990. No. 91. - 371–383.

Crim, L. W., Glebe, B. D. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LH RH analog. // Aquaculture. - 1984. No. 43. - 47–56.

Erdahl, D., McClain, J. Effect of LH-RH analogue treatment on egg maturation (ovulation) in lake trout brood stock. // Prog. Fish. Cult. - 1987.- No. 49. - 276–279.

Gillet, C., Breton, B., Mikolajczyk, T. Effects of GnRHа and pimozide treatments on the timing of ovulation and on egg quality in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) at 5 and 10 °C. Aquatic Living Resources. // 1996. – No. 9. - 257–263.

Goren, A., Gustafson, H., Doering, D. Field trials demonstrate the efficacy and commercial benefit of a GnRHa implant to control ovulation and spermiation in salmonids. // Goetz F. W., Thomas P. (eds): Reproductive Physiology of Fish Fish symposium 95, Austin, Texas. - 1995. - 99-101.

Haffray, P., Enright, W. J., Driancourt, M. A., Mikolajczyk, T., Rault, P., Breton, B. Optimalization of breeding of Salmonids: Gonazon™, the first officially approved inducer of ovulation in the EU. // World Aquaculture. – 2005. - 52-56.

Kouřil, J., Švinger, V., Mikodina, E. V., Sedova, M. A., Pavlišta, R., Hamáčková, J. Induced and synchronized ovulation and other improvements of artificial reproduction in Northern whitefish (*Coregonus peled*) using hormonal stimulation and anaesthesia // Litvinenko, A. I. and Reshetnikov, Yu. S. (eds.). Biology, Biotechnology of Breeding and Condition of Whitefish Stocks, 7-th International Scientific and Practical Workshop, Tyumen (Russia). 2010. - 219-222.

Mikolajczyk, T., Kuzmiński, H., Dobosz, S., Goryczko, K., Enright, W. J. The effects of Gonazon TM, a commercially available GnRH analogue, on ovulation and egg quality in cultured whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) // Biology and management of Coregonid Fishes. - 2005. No 60. - 187-194.

Mikolajczyk, T., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Szczerbik, P., Duc, M., Goryczko, K., Dobosz, S., Glogowski, J., Epler, P., Enright, W. J. The effects of the GnRH agonist, azaglynaforelin (Gonazon™), on ovulation and egg viability in the European grayling (*Thymallus thymallus* L.). // Aquaculture. - 2008. No 281. - 126–130.

Mylonas, C. C., Hinshaw, J. M., Sullivan, C. V. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. // Aquaculture. -1992. No 106. - 379–392.

Noori, A., Amiri, B. M., Mirvaghefi, A., Baker, D. W. LHRHa-induced ovulation of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17 α -hydroxyprogesterone. // Aquaculture Research. - 2010. - No 41. - 871–877.

Olito, C., Loopstra, D., Hansen, P. Acceleration of sexual maturation in chinook salmon broodstock using luteinizing hormone-releasing hormone analog. // N. Am. J. Aquacult. - 2001. - No 63. - 208–214.

Park, W. D., Lee, Ch. H., Lee, Ch. S., Kim, D. -J., Kim, J. -H., Tamaru, C. S., Sohn, Y. Ch. Effects of gonadotropin-releasing hormone analog combined with pimozide on plasma sex steroid hormones, ovulation and egg duality in freshwater-exposed female chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture. // - 2007. No 271. - 488–497.

Podhorec, P., Kouřil, J. Induction of final oocyte maturation in Cyprinidae fish by hypothalamic factors: a review. // Veterinarni Medicina. - 2009. No 54. - 97-110.

Pratanaphon, R., Akesowan, S., Khaw, O., Sriprapat, S., Ratanabanangkoon, K. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). Vaccine. // - 1997. – No 15(14). - 1523–1528.

Safari, D., Dekker, H. A. T., Rijkers, G., Snippe, H. Codelivery of adjuvants at the primary immunization site is essential for evoking a robust immune response to neoglycoconjugates. // Vaccine. - 2011. – No 29. - 849–854.

Singh, M., O'Hagan, D. Advances in vaccine adjuvants. // Nat. Biotechnol. - 1999. – No 17(11). - 1075–1081.

Švinger, V. W., Kouril, J., Pavlista, R. Induced and synchronized ovulation in northern whitefish (*Coregonus peled*) using GnRHa (D-Tle⁶,Pro⁹-NEt) Lecirelin in different dosages. - Abstracts of Aquaculture Europe, Conference, Porto, 5–8 October 2010. – 1279–1280.

Švinger, V. W., Policar, T., Polakova, S., Steinbach, C., Jankovych, A., Kouril, J. Induction and advancement of ovulation in brook char (*Salvelinus fontinalis* Mitchell) using administration of emulsified D-Arg⁶Pro⁹NEt-sGnRHa. Abstract book of Diversification in Inland Finfish Aquaculture Conference, Pisek, 16–18 May 2011, p. 56.

Švinger, V. W., Kouril, J., Pavlista, R. Synchronization of ovulation in cultured northern whitefish (*Coregonus peled*, Gmelin 1788) using [D-Arg⁶Pro⁹Net]-sGnRH analogue and its effect on egg quality. 2011.

Vazirzadeh, A., Hajimoradloo, A., Esmaeili, H. R., Akhlaghi, M. Effects of emulsified versus saline administration of GnRHa on induction of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. // Aquaculture. - 2008. – No 280. - 267–269.

Zohar, Y., Mylonas, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. // Aquaculture. - 2001. – No 197. - 99-136.

SYNCHRONIZED OVULATION IN PELED (*COREGONUS PELED*) USING GnRHa

Kouřil J. ¹, Švinger V. ²

¹University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Institute of Aquaculture, Ceske Budejovice, Czech republic

²University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and hydrobiology, Vodňany, Czech republic

Summary

Peled adult females (fish pond origin, old 2+, individual weight of 599±73 g) were treated either with salmon [D-Arg⁶Pro⁹Net]-sGnRHa in Freund's incomplete adjuvant emulsified sustained release form (sGnRHa-FIA) or in 0.09% NaCl dissolved acute release form (sGnRHa). Approximately 2-3 weeks before natural spawning females reared into 3 flow-trough tanks (2 experimental and 1 control group, n=12) were anesthetized (clove oil, 0.03 ml/l) and intraperitoneally injected as follows: first group – sGnRHa-FIA (dose 25 µg/kg); second group – sGnRHa (dose 25 µg/kg) and third control group (received 1:1 mixture of FIA and physiological saline). The ovulation status of each female was checked every 3 days by manual stripping. Compared to control group, all treatments significantly induced synchronized ovulation. Mean latency time was reduced significantly ($P<0.05$) from 19.5±5.0 days in third control group to 15.3±2.3 and 15.3±2.9 in first and second groups, respectively. Hormonal treatments did not affect the relative fecundity.