

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

III МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

«РАЗВИТИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ АКВАКУЛЬТУРЫ» (КОНФЕРЕНЦИЯ «АКВАКУЛЬТУРА 2023»)

с применением дистанционных технологий

с. Дивноморское,
4 – 10 сентября 2023 г.

Донской государственный технический университет
г. Ростов-на-Дону
2023

COLLECTION OF SCIENTIFIC PAPERS

III INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE

"DEVELOPMENT AND MODERN PROBLEMS OF AQUACULTURE" ("AQUACULTURE 2023" CONFERENCE)

using remote technologies

Divnomorskoye,
September 4 – 10, 2023

Ростов-на-Дону | Rostov-on-Don
2023

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Б.Ч. Месхи – ректор Донского государственного технического университета, член-корреспондент Российской академии образования, д-р техн. наук, профессор

Г.Г. Матишов – заместитель президента Российской академии наук, член президиума Российской академии наук, академик Российской академии наук

С.В. Бердников – директор Южного научного центра Российской академии наук, д-р геогр. наук

Мин Тзе Лионг – профессор школы промышленных технологий по технологии биопроцессов, Университет Малайзии, Малайзия, PhD

А.В. Невредин – руководитель Евразийского аквакультурного альянса, руководитель комиссии по аквакультуре, академик Международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности (ООН)

Е.Н. Пономарёва – главный научный сотрудник Южного научного центра Российской академии наук, д-р биол. наук, профессор

Д.В. Рудой – руководитель специализированной организации территориального кластера «Долина Дона» Ростовской области, декан факультета «Агропромышленный» ДГТУ, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Центр агробιοтехнологии» ДГТУ, канд. техн. наук, доцент

А.В. Ольшевская – заместитель декана факультета «Агропромышленный» ДГТУ, заместитель руководителя Центра развития территориального кластера «Долина Дона» ДГТУ, доцент кафедры «Технологии и оборудование переработки продукции агропромышленного комплекса» ДГТУ, канд. техн. наук

М.Ю. Одабашян – старший научный сотрудник «Центра агробιοинженерии эфиромасличных и лекарственных растений», старший преподаватель кафедры «Технологии и оборудование переработки продукции агропромышленного комплекса» ДГТУ, канд. биол. наук (отв. ред.)

P17 **Развитие и современные проблемы аквакультуры (Конференция «Аквакультура 2023»):** сборник научных трудов III Международной научно-практической конференции (с. Дивноморское, 4 – 10 сентября 2023 г.) / ред. кол. Б.Ч. Месхи [и др.]; ДГТУ – Ростов-на-Дону: ДГТУ-Принт, 2023. – 145 с.

ISBN 978-5-6050870-1-4

Сборник опубликован по результатам III Международной научно-практической конференции «Развитие и современные проблемы аквакультуры», проводимой факультетом «Агропромышленный» Донского государственного технического университета, и предназначен для специалистов в области аквакультуры, охраны водных ресурсов, селекции и генетики, а также обучающихся соответствующих специальностей, и для широкого круга читателей, интересующихся научными исследованиями и разработками в этой области.

В сборнике содержатся материалы, отражающие многогранный подход к изучаемой тематике. Рассмотрены такие темы, как биоремедиация и фитоценозы, выращивание радужной форели и осетроводство, лекарства и корма для рыб, применение криотехнологий и т.д. Широкий круг вопросов свидетельствует о том, что аквакультура была и остаётся в центре внимания научного сообщества и что данная отрасль имеет первостепенное значение не только для хозяйства Юга России и всей страны в целом, а также для мирового научного и производственного сообществ, в рамках конференции объединяющих свои усилия для создания проектов, необходимых для активного развития отрасли, бизнеса и науки.

ISBN 978-5-6050870-1-4

© ДГТУ-Принт, 2023

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИСКУССТВЕННОЙ ТРИПЛОИДИЗАЦИИ СИГОВЫХ РЫБ

¹Лютиков А.А., ¹Костюничев В.В., ¹Голотин В.А., ¹Вылка М.М.

¹Санкт-Петербургский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ГосНИОРХ им. Л. С. Берга), Санкт-Петербург, 199053

Аннотация. Показана принципиальная возможность триплоидизации сиговых рыб с использованием гидростатического шока. Установлен наиболее эффективный протокол создания триплоидов нельмы, при котором воздействие на икру осуществляется давлением 650 бар в течение 5 мин спустя 340 градусо-минут после осеменения. Соблюдение данных параметров позволило получить 100% триплоидизацию и лучшую выживаемость среди подопытной икры нельмы – 34,6%, однако это существенно меньше, чем в контроле – 61,0%. Рост триплоидной и диплоидной молоди нельмы был сопоставим, однако частота встречаемости рыб со скелетными деформациями значительно выше у триплоидов (в 6 раз), при более низкой выживаемости, чем у диплоидов – 44,5 против 55,6%. Как правило, нарушения в развитии скелета выражаются в искривлении хвостового отдела позвоночника и деформации челюстного аппарата.

Ключевые слова. Сиговые, триплоиды, гидростатический шок, цитометрия

PRELIMINARY RESULTS OF STUDIES ON ARTIFICIAL TRIPLOIDIZATION OF WHITEFISH

¹Lyutikov A.A., ¹Kostyunichev V.V., ¹Vylka M.M., ¹Golotin V.A.

¹St. Petersburg branch of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (State Research Institute of Lake and River Fisheries named after L.S. Berg), Makarova Emb. 26, 199004 St. Petersburg, Russia

Abstract. Obtaining triploid fish in modern aquaculture is aimed to solve the problem of growth reduction during the maturation of cultivated objects. Our study shows a fundamental possibility of triploidization of whitefish from Coregonidae family (in particular *Stenodus leucichthys nelma*) with the use the hydrostatic shock. The triploidization experiment included a control and five experimental timepoints within a time period of 204-476 degree-minutes after fertilization. In each of them inseminated nelma eggs were placed under hydrostatic pressure of 650 bar for 5 minutes with a time interval of 68 degree minutes. The most effective protocol for obtaining nelma triploids was established at 340 degree minutes after insemination that made it possible to obtain a triploidization rate close to 100% according to flow cytometry results. The best survival among experimental nelma eggs was 34.6%, however, this is significantly less than in the control (61.0%). The growth rate of obtained triploid and diploid were comparable, however, the survival rate in triploids was lower: 44.5% (55.6% in diploids) with a 6-times higher incidence of skeletal deformities. Disturbances in skeleton development are expressed generally in the caudal spine curvature and jaw deformation.

Keywords. Whitefish, triploids, hydrostatic shock, cytometry

Введение. Современная аквакультура направлена на получение таких объектов рыбоводства, которые характеризуются наилучшими продукционными свойствами. Как правило, культивируемые объекты демонстрируют высокий ростовой потенциал до момента половозрелости, с наступлением которой происходит значительное снижение темпа роста, выживаемости и, вместе с тем, качества рыбной продукции. Одним из решений данной проблемы является использование в аквакультуре триплоидных рыб, которые по своей природе являются частично или полностью стерильными, что достигается путем нарушения процесса мейоза при формировании зародышевых клеток.

Целью настоящей работы было исследовать возможность получения триплоидов сиговых рыб, которые в нашей стране являются одними из наиболее ценных и распространенных промысловых видов, и широко используются в товарной аквакультуре. Для разработки протоколов триплоидизации

сиговых в качестве ориентира использовали данные по получению триплоидов лососевых рыб, чьи взрослые триплоидные особи культивируются для массового коммерческого производства [1]. Для различных видов лососевых, применяют схожие протоколы триплоидизации с использованием гидростатического шока: давление в момент обработки икры составляет от 500 до 700 бар (или 7000-10000 psi), время после осеменения находится в диапазоне 30-40 мин в зависимости от температуры воды, которая в различных экспериментах варьирует в пределах 6-10°C, экспозиция составляет 4-6 мин, иногда больше [2]. Соблюдение данных условий позволяет получать у лососевых видов рыб до 100% триплоидов при выживаемости икры до 80-90% [3].

Материал и методы исследования. Исследования проводили в производственных условиях рыбоводного хозяйства ООО «Форват» (оз. Суходольское, Приозерский р-н, Ленинградская обл.). В качестве объекта исследований была выбрана нельма *Stenodus leucichthys nelma*, от двух производителей которой получали икру объемом 730 мл (около 75 тыс. икринок) и сперму (12 мл). Собранные половые продукты были равномерно разделены на 6 равных порций, после чего индивидуально смешаны с добавлением воды, что считалось нулевой точкой в эксперименте.

Эксперимент по триплоидизации состоял из пяти различных вариантов опыта, в которых икра нельмы была подвергнута гидростатическому шоку (650 бар) через 30 мин после осеменения – вариант опыта Т30, 40 мин – Т40, 50 мин – Т50, 60 мин – Т60 и 70 мин – Т70. Экспозиция составляла 5 мин, сброс давления до атмосферного занимал около 2-3 с. Контрольной выступала икра без обработки – Д0. Температура воды во время манипуляций с икрой составляла 6,8°C. Для обработки икры использовали специализированный коммерческий электрогидравлический аппарат TRC-APV™ (TRC Hydraulics Inc., Канада).

После вылупления для оценки роста и выживаемости подопытных предличинок рассаживали поштучно в экспериментальные 60-литровые бассейны (фактический объем воды в бассейне составлял 40 л) по 600 экз. в каждый (15 экз./л), за исключением личинок, полученных из икры, обработанной на 70 мин после сбора, их количество на этапе вылупления составляло 163 экз. Нумерацию опытов при рассадке сохраняли.

Для диагностирования триплоидии нельмы использовали общепринятые цитогенетические и цитометрические методы [3]. Статистическую обработку материала проводили с использованием прикладной программы Stadia (версия 8.0). В качестве статистического критерия при сравнении двух выборок применяли критерий Пирсона (хи-квадрат). Различия считались значимыми при уровне $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$).

Результаты. Инкубация икры. Количество выживших эмбрионов нельмы на 5-е сутки после обработки высоким давлением (стадия мелкоклеточной бластулы) во всех опытных вариантах и контроле находилась в диапазоне 95,7-97,1%, за исключением икры, обработанной на 70 мин после осеменения – её выживаемость составила 59,1% (табл. 1). На 20-е сут развития, когда зародыш огибает около половины желтка, икра, обработанная последней в опыте (70 мин), характеризовалась высокой смертностью – более 90% относительно этапа бластуляции. Остальная подопытная и контрольная икра имела схожую выживаемость – от 74,3 до 78,9%, кроме икры, из варианта опыта Т40, её выживаемость составила 39,8%. Значительное сокращение доли живых эмбрионов, особенно у подопытной икры (более чем в два раза по сравнению с предыдущим этапом), произошло на 34 сут развития с началом пульсации сердечной трубки, в варианте опыта Т70 доля живых икринок составляла менее 1%. Выживаемость контрольной икры снизилась на 12,4% (табл. 1). К концу инкубации лучшей выживаемостью характеризовалась контрольная икра – 61,0%, среди подопытной икры наибольший процент выживших икринок был в вариантах опыта Т50 и Т60 – 34,6 и 28,7%, соответственно, наименьшая выживаемость икры (8,1%) была в варианте опыта Т40 (табл. 1).

Таблица 1 - Выживаемость контрольной и подопытной икры нельмы, обработанной высоким давлением, на различных этапах эмбрионального развития, %

Вариант опыта, №	Д0	Т30	Т40	Т50	Т60	Т70
Время обработки икры давлением после осеменения, мин	0	30	40	50	60	70
Мелкоклеточная бластула, 5 сут.	95,7±2,1 ^a	97,1±1,9 ^a	96,8±1,7 ^a	95,9±2,0 ^a	96,3±2,2 ^a	59,1±1,2 ^b

Формирование зародыша, 20 сут.	78,7±1,6 ^a	74,3±1,6 ^a	39,8±1,8 ^b	78,9±1,5 ^a	76,6±1,4 ^a	5,4±0,1 ^c
Пulsация сердечной трубки, 34 сут.	66,3±1,1 ^a	32,8±0,9 ^b	24,5±0,8 ^c	46,0±1,0 ^d	43,4±0,9 ^d	<1,0
Вылупление, 172-176 сут.	61,0±0,7 ^a	18,4±0,4 ^b	8,1±0,2 ^c	34,6±0,5 ^d	28,7±0,5 ^e	около 0

Здесь и далее – значения с различными буквенными индексами в пределах одной строки имеют достоверные различия при уровне значимости $p \leq 0,05$

Определение плоидности икры. Использование проточной цитометрии на этапе крупноклеточной морулы (4 сутки эмбрионального развития) показало высокую степень триплоидизации икры, близкую к 100%, обработанную давлением через 50 и 60 мин после осеменения. Воздействие на икру высоким давлением через 30, 40 и 70 мин после осеменения приводит к появлению бимодальных групп, состоящих из диплоидов и триплоидов в соотношении 1/3-2/3.

Выращивание молоди. Лучшие ростовые качества были у личинок из вариантов опыта Т30 и Т50, которые к концу выращивания достигли 1,39 и 1,40 г, соответственно. Худший рост на всем протяжении исследований был у личинок из вариантов опыта Т40 и Т60, их конечная средняя индивидуальная масса составила 1,20 и 1,14 г (табл. 2). Конечная масса контрольных личинок составила 1,33 г. Наиболее высокая итоговая выживаемость была у контрольных (64,4%) и подопытных личинок из вариантов опыта Т50 (65,0%) и Т60 (68,1%), относительно низкой выживаемостью характеризовались личинки из вариантов опыта Т30 (56,4%) и Т40 (53,3%). Наибольшая ихтиомасса в эксперименте была в варианте опыта Т50 и составила 544 г, что на 30 г больше, чем в контроле (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты выращивания личинок и мальков контрольной и подопытной нельмы (период выращивания 62 сут, начальная масса личинок – 12,66-13,20 мг)

Вариант опыта, №	Д0	Т30	Т40	Т50	Т60
Масса конечная, г	1,33±0,01 _a	1,39±0,02 _a	1,20±0,01 _b	1,40±0,02 _a	1,14±0,01 _b
Выживаемость, %	64,4	56,4	53,3	65,0	68,1
Ихтиомасса, г	515	471	382	544	464

Далее контрольная молодь и молодь из варианта опыта Т50, определенная методом проточной цитометрии как триплоидная, были высажены на последующее доращивание в два садка размером 2×2×2 м, установленных в озере. По итогам 123 сут. выращивания средняя индивидуальная масса рыб-триплоидов составила 29,73±1,32 г, контрольных особей – 24,74±2,44 г, различия не достоверны.

Выживаемость триплоидов за период садкового выращивания составила 44,5%, при этом 11,6% особей были с различными отклонениями, связанными в большей степени с деформацией хвостового отдела позвоночника и челюстного аппарата. Сеголетки с дефектами значительно отставали в росте от нормальной молоди, и, вероятно, характеризовались повышенной смертностью, что послужило снижению выживаемости у триплоидных рыб. Выживаемость контрольной нельмы за аналогичный период составила 55,6% при частоте встречаемости уродств у рыб менее 2%.

Гематологический анализ. Показатели крови сеголеток нельмы с разной плоидностью, представленные в таблице 3, имели значительные отличия, за исключением содержания гемоглобина (60,4-60,6 г/л) и незрелых эритроцитов (8,4-8,5%). У триплоидных особей отмечено достоверное снижение в крови эритроцитов до 0,58 млн./мкл, против 0,77 млн./мкл у диплоидов, которое, вероятно, компенсируется повышенным (на 25%) содержанием гемоглобина в эритроците (СГЭ) по сравнению с диплоидными рыбами (табл. 3). Повышение СГЭ у триплоидов происходит за счет увеличения самих клеток эритроцитов и их ядер, которые, соответственно, в 1,7 и 1,3 раза больше, чем аналогичные показатели у диплоидных особей (рисунок). На фоне увеличения размеров клеток и ядер эритроцитов у триплоидов наблюдается снижение ядерно-плазматического отношения (ЯПО) до 0,16, относительно 0,21 у диплоидов. Вследствие увеличения объема ядер и клеток у триплоидов происходит уменьшение соотношения площади поверхности ядер и клеток к объему.

Таблица 3 – Гематологические показатели диплоидных (контроль) и триплоидных сеголеток нельмы

Показатель	Диплоиды	<i>Cv</i>	Триплоиды	<i>Cv</i>
Гемоглобин, г/л	60,4±1,26 ^a	6,6	60,6±1,27 ^a	6,6
Эритроциты, млн./мкл	0,77±0,03 ^a	12,3	0,58±0,03 ^b	13,9
Содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ), пг	79,7±4,10 ^a	16,3	106,5±5,20 ^b	15,4
Объем эритроцита, мкм ³	306,3±11,56 ^a	11,9	507,1±7,79 ^b	4,9
Объем ядра эритроцита, мкм ³	65,3±2,22 ^a	10,8	83,49±1,28 ^b	4,9
Ядерно-плазматическое отношение (ЯПО)	0,21±0,004 ^a	5,4	0,16±0,002 ^b	3,9
Сегментоядерные эритроциты, %	0,4±0,09 ^a	116,5	3,6±0,26 ^b	37,3
Незрелые эритроциты из 500 шт., %	8,5±1,32 ^a	49,1	8,4±0,81 ^a	30,5
Лейкоциты, тыс. шт./мкл	16,2±1,41 ^a	44,1	4,6±0,50 ^b	68,1

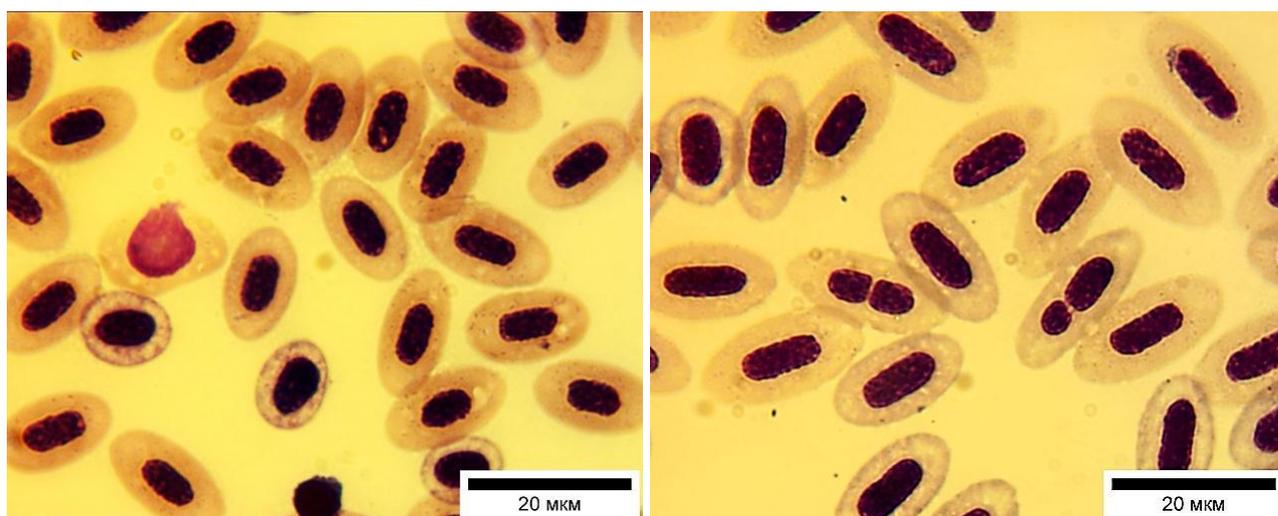


Рисунок 1 - Слева – клетки крови сеголеток диплоидной нельмы (контроль), справа – клетки триплоидов нельмы. Стрелками указаны сегментоядерные эритроциты.

Кровь триплоидов характеризуется наличием относительно большого количества сегментоядерных эритроцитов (рисунок), встречаемость которых у сеголеток нельмы определена на уровне 3,6%, у диплоидов – 0,4% (табл. 3). В целом, сегментация ядер эритроцитов свойственна триплоидам лососевых рыб (Benfey, 1999). В структуре белой крови нельмы значительные отличия выявлены в содержании лейкоцитов, которых в 3,5 раза меньше у триплоидных особей – 4,6 против 16,2 тыс. шт./мкл у диплоидов (табл. 3), при норме – 15-30 тыс. шт./мкл (Серпунин и др., 2010). В остальном все показатели крови у исследуемой нельмы находятся в пределах нормы, установленной для сиговых рыб. Признаков анемии у сеголеток не обнаружено.

Заключение. Результаты настоящих исследований указывают на принципиальную возможность триплоидизации сиговых рыб с использованием гидростатического шока. Установлен наиболее эффективный протокол создания триплоидов нельмы, при котором воздействие на икру осуществляется давлением 650 бар в течение 5 мин спустя 340 градусо-минут после осеменения. Соблюдение данных параметров позволило получить 100% триплоидизацию и лучшую выживаемость среди подопытной икры нельмы – 34,6%, однако это существенно меньше, чем в контроле – 61,0%.

Рост триплоидной и диплоидной молоди нельмы был сопоставим, однако частота встречаемости рыб со скелетными деформациями значительно выше у триплоидов (в 6 раз), при более низкой выживаемости, чем у диплоидов – 44,5 против 55,6%. Как правило, нарушения в развитии скелета выражаются в искривлении хвостового отдела позвоночника и деформации челюстного аппарата.

Применение методов оценки триплоидизации с использованием проточной цитометрии позволило достоверно определить наличие триплоидов в экспериментальных группах в количестве от 35 до 100%, что показывает эффективность данного метода на сиговых рыбах, особенно на ранних этапах эмбрионального развития. Исследование гематологических параметров сеголеток нельмы также дает представление о результатах триплоидизации – у триплоидов достоверно крупнее клетки и ядра, а также выше частота встречаемости сегментоядерных эритроцитов.

Список использованных источников

1. Natural and artificial polyploids in aquaculture/L. Zhou, J. Gui// Aquaculture and Fisheries. – 2017. – Vol. 2. – P. 103–111.
2. Optimisation of triploidy in brown trout (*Salmo trutta* L.)/A.C. Preston [et al.]// Aquaculture. – 2013. – Vol. 414–415. – P. 160–166.
3. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids/T.J. Benfey [et al.]// Can J Fish Aquat Sci. – 1984. – Vol. 41. – Iss. 6. – P. 980–984.
4. The physiology and behavior of triploid fishes/T.J. Benfey// Rev. Fish. Sci. – 1999. – Vol. 7. – P. 39–67.
5. Морфофизиологические и гематологические показатели молоди сига, выращиваемой на различных кормах/Г.Г. Серпунин [и др.]// Известия КГТУ. 2010. № 19. С. 196–203.

Исследование поддержано грантом РФФ номер 23-26-00257.