

УДК: 639.3.03:597.553.2

К.В. Метальникова*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП ВНИРО)*

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМЫ РЕВЕРСАНТОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОМОВ САМОК

В 1939 г. Bridges (1939) предложил теорию о влиянии на формирование пола животных помимо количественного соотношения половых хромосом также и «генного баланса всего кариотипа». Впоследствии эта теория получила научное развитие и на рыбах (Yamamoto, 1969 – Kitano et al., 2004). В 1969 г. Г.М. Персов высказал предположение, что первичной функцией стероидных гормонов является контроль мейоза при спермиогенезе и оогенезе, и подтвердил это на лососевых видах рыб. Впоследствии эта теория была обоснована экспериментально и на других костистых рыбах (Colombo et al., 1979). Суть теории заключается в том, что при формировании половых желез у рыб: в гипоталамусе вырабатываются гонадолиберины (рилизинг-факторы), которые, поступая в гипофиз, регулируют синтез гонадотропных гормонов (ГТГ) гипофизом, ГТГ через кровеносную систему поступают к гонадам, в стероидпродуцирующие клетки, которые есть у самок и самцов лососевых рыб (Mosyagina et al., 2004). В этих клетках вырабатываются андрогены, стимулирующие развитие вторичных половых признаков у рыб. Исследования проводились на горбуше, кижуче, моллинезии, стальноголовом лососе, атлантическом лососе, трехиглой колюшке и других видах рыб. Все авторы отмечают зависимость андрогенеза у рыб от внешних факторов: от температуры воды (известен температурный оптимум активности ферментов, вовлеченных в стероидогенез у разных видов рыб), стресса, введения андрогенов через корм и других внешних факторов. Получившиеся, в результате обработки андрогенами, реверсанты имеют нормальное поведение, что обуславливается соответствующими биохимическими процессами в их организмах (Bhandari, Higa, Nagahama, Nakamura, 2004). Впоследствии исследования были продолжены и на морских рыбах (Kitano et al., 2004): японский паралихт или ложный палтус (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel, 1846) - костистая рыба с детерминированным механизмом определения пола, у которой самки XX, а самцы XY. XX личинки могут быть переопределены в фенотипических самцов путем выращивания их при вы-

сокой температуре воды или обработкой андрогенами в период дифференцировки пола. Однако механизм влияния высокой температуры воды и механизм влияния андрогенов на переопределение пола не были изучены у ложного палтуса *Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel, 1846, в связи, с чем и было проведено данное исследование. В результате выяснили, что 11КТ стимулирует половую реверсию регулированием активности мРНК статистически определяемыми фенотипическими признаками: активностью стероидогенетических ферментов (ферментов) и ингибирующим веществом Мюллера (MIS). Морфологическая дифференцировка гонад у ложного палтуса наблюдается в 60 дней после вылупления. С этого времени семенные ампулы формировались в видоизмененные семенники спустя 80 дней при действии 11КТ и при повышенной температуре воды. Через 100 дней XX гонады у ложных палтусов, обработанных 11КТ, имели более зрелые семенные ампулы, чем у тех рыб, которых выращивали при высокой температуре воды. В результате исследований пришли к выводу, что 11КТ вовлекался в формирование семенных ампул в период тестикулярной дифференциации у ложного палтуса. (Kitano et al., 2004). У пресноводных рыб (Hurk van Den et al. 1982), как и у исследованных морских рыб, механизм фенотипического определения пола при воздействии андрогенами, при определенных внешних условиях, носит общий характер. На основании этой теории были разработаны методы регуляции формирования вторичных половых признаков у рыб с использованием андрогенов. К настоящему времени практическое использование влияния стероидных гормонов на формирование вторичных половых признаков известно более чем у 120 видов рыб. Но наибольшее распространение применение этой методики нашло для лососевых видов рыб. Лишь некоторые авторы исследовали методику формирования вторичных половых признаков под внешним воздействием андрогенов у рыб на осетровых гибридах, например бестере (Метальникова, 1989; Omoto et al., 2002).

В России на форели и стальноголовом

лососе использовали эту методику в период 1978-1996 гг. Для получения половых реверсантов у рыб использовали разные способы: кормили комбикормом с добавками метилтестостерона (МТ) и тестостерон-пропионата (ТП) (на спиртовой и масляной основах) с перехода личинок на внешнее питание, дополнительно купали в растворе метилтестостерона на стадии выклева (в арктических условиях), использовали форель, полученную с использованием гиногенетической методики (Gorshkov et al., 1990). При сравнении этих способов выяснили, что лучшие результаты наблюдали при предварительном купании икры лососей перед вылуплением личинок в растворе метилтестостерона и дальнейшем кормлении молоди кормами с добавлением андрогенов в конкретных дозировках (таблица 1).

Принципиальное отличие нашей методики от применяемой за рубежом и другими российскими исследователями заключается в отборе реверсантов по фенотипическим показателям, сформированным не только под воздействием генотипа, но и внешней среды. Андрогены, проникая через пищеварительный тракт в кровь рыб, воздействовали на мозг, гипоталамо-гипофизарную систему и гонады, вызывая серьезные соматические перестройки всего организма, стимулируя анаболические процессы на клеточном уровне и переориентируя формирование вторичных половых призна-

ков у генетических самок (Thorgaard, 1983; Choy et al., 1996, Метальникова, 1989, 1991, 1995, 2000, 2002; Metalnikova, 2002). После созревания реверсантов, их использовали в скрещиваниях с прижизненным взятием половых продуктов, что позволяло получать половые продукты от одних и тех же реверсантов ежегодно. Процессы реверсии пола у обработанных аналогами тестостерона рыб продолжают после окончания обработки рыб гормонами и завершаются формированием у самок вторичных половых признаков полноценных самцов, продуцирующих сперму. При оплодотворении обычных яйцеклеток такой спермой в потомстве получали преимущественно самок. У самок, потомства реверсантов в F_1 , нашли высокодостоверные корреляционные связи между массой и длиной тела с родительским поколением в одном возрасте: у форели из НВХ в Калининградской области и у стальноголового лосося в субтропиках ($r=(-0,88)-(+0,71)$ и $r=(-0,78)-(+0,75)$, соответственно при $p<0,05$). По-видимому, длина рыбы и масса тела у лососевых передаются по наследству индивидуально, по линии самок. Внедрение, разработанной во ВНИРО методики по половой реверсии у лососей, провели в Заполярье - до взрослых половых реверсантов и в Калининградской области с 1990 по 1997 годы с получением от потомства половых реверсантов молоди в следующем поколении (Метальникова, 1995; Метальникова, Голубев, 2000; Металь-

Таблица 1

Схема экспериментов и результаты влияния андрогенов на гонады форели

Oncorhynchus mykiss (Walbaum), место работы, год, местное название рыбы	Дозы МТ, мг/кг корма	Дозы ТП, мг/кг корма	Выход рыбы с реверсией гонад, %
оз. Селигер, 1980, форель	не проводили	1	88,2
	не проводили	6	83,3
	не проводили	16	100,0
Краснодарский край, 1985 г., стальноголовый лосось	3	3	81,8/66,8*
	6	6	77,8/77,8*
Калининградская обл., 1990, форель	3 (после гиногенеза и купания икры в р-ре МТ)	нет**	100,0
	6	нет	92,8
	не проводили	6	83,3
Калининградская обл., 1996, форель	5		75,0
Заполярье, 1991, форель	3 (после купания в р-ре в 437,1 мкг МТ/л H_2O)	нет	83,0
	6	нет	85,7

Примечание: * – в числителе выход самок с половой реверсией при обработке молоди метилтестостероном, в знаменателе – при обработке молоди стальноголового лосося тестостерон-пропионатом, ** – не проводили

никова, 2002). Для восстановления деградировавших популяций, с утраченным геномом самок, у рыб с использованием методов криоконсервации спермы половых реверсанта, предлагаем две схемы, созданные в соавторстве с Ананьевым В.И. (2002):

Схема 1

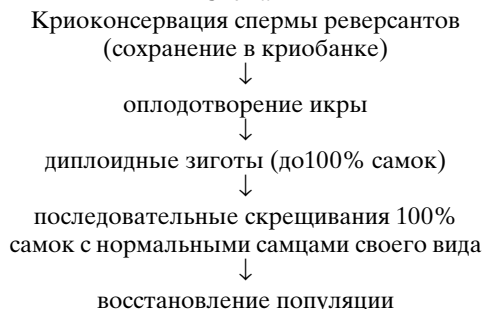
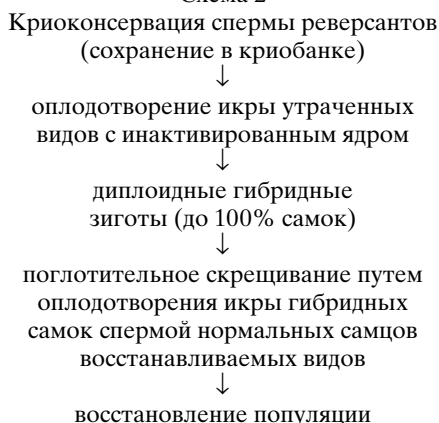


Схема 2



Литература

1. Метальникова К.В. 1989. Современные проблемы рыбохозяйственных исследований. М.: ВНИРО. С. 89-99. 1991. Рыбное хозяйство. 1991, №12. С. 59-61. 1995. Матер. Совещ. по товарному форелеводству. Мурманск. С. 48-51. 2000. Рыбное хозяйство. Сер. «Пресноводная аквакультура» ВНИЭРХ. Вып. 4. 19-24. 2002. Экологическая физиология и биохимия рыб в аспекте продуктивности водоемов. М.: Изд.-во ВНИРО. Т. 141. С. 129-137. 2002.
2. In tes. 21th Conference of European Comparative Endocrinologists (ESCE) 26-31 August, 2002. Bonn.c.1. 2004. Ananiev V. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology from September 5 to September 9, 2004 at the University Jaume I (UJI) of Castellon, Spain. www.5isfe.uji.es. P. 32.
3. Персов Г.М., 1969. Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук. 24 с.
4. Choy L. Hew et al., 1996. Determination of genomic sex in salmonids. Patent: №5,480,774 Date Patent: Jan. 2.
5. Colombo L.R. et al., 1979. In: Bull.Zool. 15 (11). P. 89-101.
6. Gorshkov S.A. et al. 1992. In: The Rainbow Trout. // Proc. 1st Aquacult. Symp. / Inst. Aquacult. University Stirling.-Scotland 4-7 Sept. 1990. Ed. G.A. Gall. USA. Amsterdam-London-New York-Tokyo. P. 99-100.
7. Hurk van Den, 1982. In: Reprod. Nutr. Develop. 22 (2). P. 413-425.
8. Kitano T., Yoshinaga N., Adachi R., Abe S. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology from September 5 to September 9, 2004 at the University Jaume I (UJI) of Castellon, Spain. www.5isfe.uji.es. P. 20-21.
9. Mosyagina M.V., Zelennikov O.V. 2004. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology from September 5 to September 9, 2004 at the University Jaume I (UJI) of Castellon, Spain. www.5isfe.uji.es. P. 20-21.
10. Omoto N., Maebayashi M., Mitsunashi E., Yoshitomi K., Adachi S., Yamauchi K. 2002. In: Fisheries Science, 68. P. 1047-1054.
11. Thorgaard G.H. 1983. In: Fish physiology. Part 9B. Acad. Press. P. 405-434.
12. Yamamoto T., 1969. In: Fish physiology New York. 3. P. 117-175.

УДК 636.619.2.32/38

В.А. Багиров, Л.К. Эрнст, Ш.Н. Насибов
ВИЖ

ТЕХНОЛОГИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЕНИ – МЕТОД СОХРАНЕНИЯ И РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Возможность использования эпидидимального семени разных видов животных с целью получения потомства была доказана еще Ивановым И.И. (1910), Эрнст Л.К. и др. (1986), Шайдуллин И.Н. (1988), Абилов А.И. и др. (1994), Багиров В.А. (2005) подтвердили перспективность использования

этого метода, получив потомство на основе гибридизации различных видов животных. Криоконсервация эпидидимального семени на сегодня осуществлена у снежного барана (Шайдуллин И.Н., 2004) и зубра (Абилов А.И. и др., 1994).

Целью наших исследований явилась