

## О ПЛОИДНОСТИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ, ВЫРАЩИВАЕМОЙ В ПРОВИНЦИИ ЛАМ ДОНГ НА ХОЗЯЙСТВЕ КЛОНГ КЛАНЬ

Е.В. ГАНЖА<sup>(1)</sup>, Е.Д. ПАВЛОВ<sup>(1)</sup>, ВО ТХИ ХА<sup>(2)</sup>, НГУЕН ВЪЕТ ТУИ<sup>(3)</sup>

### ВВЕДЕНИЕ

В южном Вьетнаме на рыбноводном хозяйстве Клонг Клань в течение шести последних лет проводится успешное культивирование радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (= *Parasalmo mykiss*). Хозяйство Клонг Клань импортировало икру форели из Финляндии (2007 г.) и из США (2008 г.). Из всей завезенной икры должно было вырасти однополое женское стадо. Поскольку вся радужная форель на хозяйстве была представлена только самками, требовалось искусственно провести инверсию пола у части вылупившихся личинок (икра из США), с целью последующего формирования собственного однопологоматочного стада и осуществления искусственного воспроизводства на основе собственных производителей. Проведенный в 2010 г. гистологический анализ (Павлов и др., 2013) выявил значительные аномалии в строении половых желез не только у рыб, подвергнутых инверсии пола, но и у контрольной группы рыб, выращенных из той же партии икры. Гонады у исследованных рыб в возрасте 1+ практически не развивались, причем в контрольной группе количество таких дистрофичных гонад было значительно бóльшим, чем в подопытных группах. В связи с тем, что условия содержания радужной форели на хозяйстве не могли привести к таким серьезным нарушениям репродуктивной функции у всего стада, была выдвинуто предположение, что форель, полученная из икры, завезенной из США, триплоидна. Известно, что у рыб-триплоидов уже на ранних этапах жизненного цикла может быть заблокирована дифференцировка пола и дальнейшее развитие половых клеток (Gervai et al, 1980; Thorgaard, 1983), что и приводит к недоразвитию их гонад. Отметим, что американская компания Troutlodge, являющаяся поставщиком посадочного материала для хозяйства Клонг Клань, продает как диплоидную, так и триплоидную радужную форель, поэтому сохранялась вероятность импорта триплоидной форели.

В соответствии с вышеизложенным, целью данной работы состояло определить плоидность радужной форели, культивируемой на хозяйстве Клонг-Клань.

### МЕТОДИКА

Объект исследования - радужная форель, выращенная в аквакультуре высокогорного района провинции Лам Донг. Материал по радужной форели собран в в апреле-июне 2010 г. на экспериментальном рыбноводном хозяйстве "Клонг Клань" (Klong Klanh) Научно-исследовательского института аквакультуры № 3 (Research Institute of Aquaculture № 3 - RIA 3). Хозяйство расположено в 50 км на северо-восток от г. Да Лат на высокогорном плато (1485 м над уровнем моря), разделено руслом реки на 2 участка, с каскадным водоснабжением каждого из горных речек (рис. 1).



**Рис. 1.** Схема бассейнов хозяйства Клонг-Клань, построенная на основе координат GPS

Определение пloidности рыб проводили по косвенной методике основанной на различиях в размерах эритроцитов у диплоидных и триплоидных рыб (Васильев и др., 2005; Лебедева, 2007; Wlasow et all, 2004; Dorota et all, 2006; Jankun et all, 2007). Известно, что размерные показатели эритроцитов у триплоидов несколько превышают таковые у диплоидов. Цитометрический анализ эритроцитов проводили у рыб трех возрастов: Сеголетки, годовики, двухлетки. Двухлеткам соответствовали половозрелые самки, выращенные из икры, завезенной из Финляндии; а годовикам - рыбы, выращенные из икры, импортированной из США. Сеголетки радужной форели были получены на хозяйстве путем оплодотворения икры от двухлеток форели, спермой самцов, привезенных с другого хозяйства, расположенном на севере Вьетнама.

Для цитометрического анализа эритроцитов на предметные стекла делали мазки крови, которые затем окрашивали азур-эозином по Романовскому и изучали под микроскопом Leica DC на увеличении ок.  $10 \times$  об. 100. Использовали две методики - упрощенная, заключающаяся в измерении диаметра ядра и площади эритроцита (Васильев и др., 2005; Wlasow et all, 2004), и вычисление ядерно-плазматического отношения (ЯПО) (Янкова, 2006; Апаликова, 2008), которое рассчитывали по формуле:  $\text{ЯПО} = \frac{\text{площадь ядра}}{\text{площадь клетки}}$ . Измерения эритроцитов и их ядер осуществляли при помощи программы Image J. По размеру ядер, площади эритроцитов и ядерно-плазматическому соотношению у изученных рыб судили о пloidности.

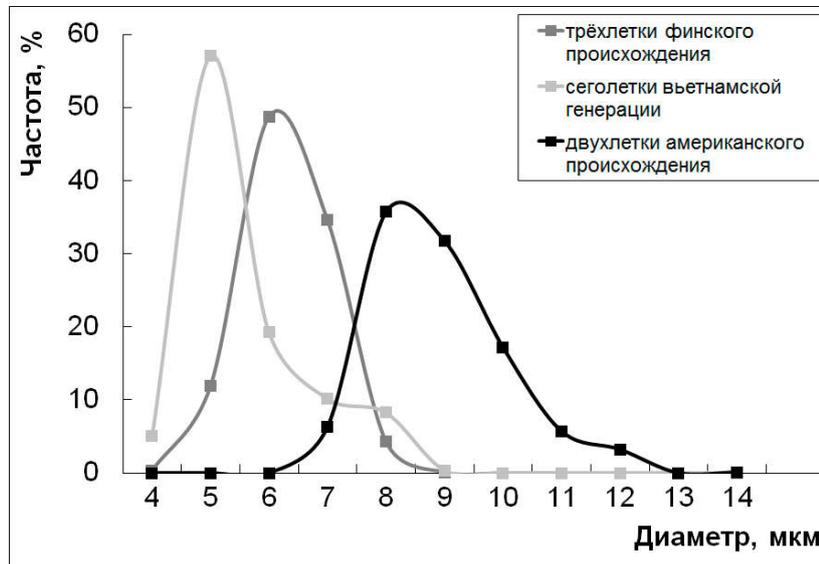
Измерение площади эритроцитов проведено у 18 сеголеток, 34 годовиков и 12 двухлеток (всего 4435 измерений), а ядерно-плазменного отношения - у 6, 7 и 6 экз. рыб (всего 351 измерение) соответственно.

Статистическая обработка материала выполнена с использованием прикладной программы Microsoft Office Excel 2003. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерены диаметры ядер эритроцитов у подопытных групп двухлеток (вливали андрогенным гормоном с целью переопределения пола), производителей радужной форели в возрасте 2+ и сеголеток вьетнамской генерации (рис. 2). В крови рыб в возрасте 1+, выращенных из американской партии икры, средний диаметр ядер эритроцитов составлял  $8,9 \pm 0,04$  (6,0-14,0) мкм, у особей финского происхождения в возрасте 2+ -  $6,3 \pm 0,02$  (5,0-10,5) мкм, а у сеголеток вьетнамской генерации -  $5,6 \pm 0,04$  (4,0-9,0) мкм. Различия между первой и второй, первой и третьей возрастными группами рыб достоверны ( $p < 0,001$ ). Сходные различия в диаметре ядер эритроцитов были отмечены в крови диплоидного и триплоидного гольца *Salvelinus fontinalis* (Woznicki, Kuzminski, 2002). Так, диаметр ядер у эритроцитов в крови диплоидного гольца варьировал от 5,9 до 8,5 мкм, а у триплоидного - от 8,2 до 10,6 мкм.

Отметим, что диаметры ядер эритроцитов у производителей радужной форели достоверно крупнее, чем у их потомства, что, вероятно, обусловлено увеличением размеров эритроцитов в крови радужной форели на протяжении ее жизни. Исходя из этого предположения, диаметры ядер производителей радужной форели должны быть крупнее, чем у двухлеток, либо не различаться. Однако размеры ядер эритроцитов в крови трехлеток достоверно (в 1,4 раза, при  $p < 0,001$ ) мельче, чем у двухлеток, что указывает на триплоидию последних (Woznicki, Kuzminski, 2002). Увеличенные ядра эритроцитов у триплоидов обусловлены бóльшим содержанием генетического материала, чем у диплоидов.



**Рис. 2.** Распределение индивидуальных размеров ядер эритроцитов в крови радужной форели американского (контроль 1+) и финского происхождения (производители и их потомство), выращенной в южном Вьетнаме.

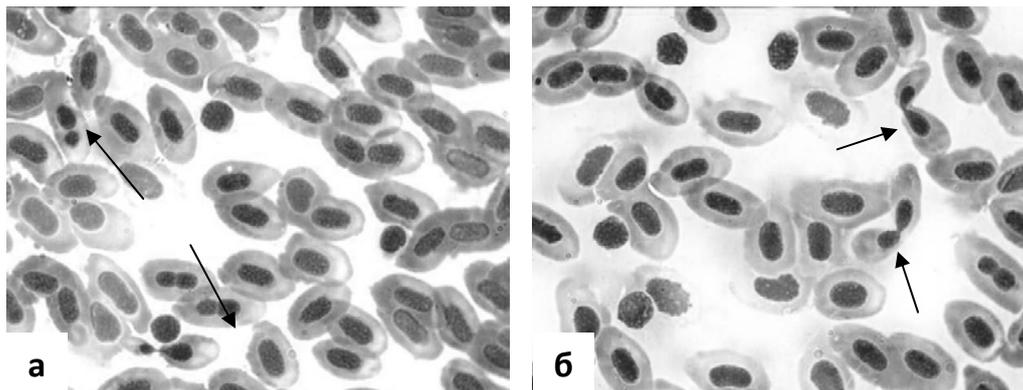
Диаметры ядер эритроцитов в крови у контрольных и подопытных особей радужной форели американского происхождения в возрасте 1+ практически не различаются ( $p > 0,05$ ) и в среднем составляют 8,7-8,9 мкм.

Средняя площадь эритроцитов в крови производителей радужной форели финского происхождения составляла  $409 \pm 5,6$  (264-587)  $\text{мкм}^2$ , ее потомства (сеголетки вьетнамской генерации) -  $384 \pm 15,2$  (151-656)  $\text{мкм}^2$ , а у двухлеток форели американского происхождения (контрольная группа) -  $584 \pm 10,1$  (367-1121)  $\text{мкм}^2$ . Эритроциты крови двухлеток форели американского происхождения достоверно ( $p < 0,001$ ) в 1,42 крупнее, чем у производителей форели финского происхождения, и в 1,52 раза больше, чем у сеголеток вьетнамской генерации. Известно, что площадь эритроцитов у триплоидных рыб примерно в 1,3-1,5 раза больше, чем у диплоидных (Васильев и др., 2005; Лебедева, 2007), что подтверждают полученные нами данные.

Ядерно-плазменное отношение характеризует изменения соотношения количества цитоплазматического и ядерного материала, произошедшие в эритроците в связи с триплоидией исследуемых нами рыб. Ядерно-плазменное отношение эритроцитов в крови производителей радужной форели финского происхождения составляло  $0,16 \pm 0,004$  (0,07-0,31), ее потомства (сеголетки вьетнамской генерации) -  $0,19 \pm 0,004$  (0,12-0,31), а у двухлеток форели американского происхождения (контрольная группа) -  $0,21 \pm 0,004$  (0,12-0,42). Различия между изученными тремя группами рыб достоверны ( $p < 0,001$ ). Очевидно, что высокий показатель у сеголеток вьетнамской генерации по сравнению с родительскими особями обусловлен различием в возрасте этих рыб. Учитывая полученные данные по форели финского происхождения, видна тенденция к снижению с возрастом объема ядерного материала по отношению к цитоплазматическому. Следовательно, можно ожидать, что ядерно-плазменное отношение у двухлеток радужной форели американского происхождения должно занимать промежуточное значение между приведёнными параметрами сеголеток (0+) и трёхлеток (2+). Однако у производителей форели финского происхождения (2+) отношение объема ядерного материала к цитоплазматическому меньше, чем у рыб американского происхождения (1+), что также может быть связано с увеличенным ядром в эритроцитах и отражать триплоидию форели американского происхождения.

Кроме крупных ядер, некоторые эритроциты в крови радужной форели в возрасте 0+ и 1+ имеют специфические нарушения, редко встречающиеся в норме. Во многих эритроцитах (5,8% у сеголеток вьетнамской генерации, 9,6% у двухлеток американской генерации) выявлена высокая доля сегментированных ("двойных") ядер (рис. 3 а). Некоторые эритроциты (1,9% у сеголеток, 2,1% у двухлеток) подвержены амитозу (рис. 3 б). В крови производителей финского происхождения в возрасте 2+ такие нарушения встречались редко. Известно (Wlasow et al, 2004), что в крови диплоидов такие аномалии эритроцитов немногочисленны, и в норме доля сегментированных ("двойных") ядер в эритроцитах не превышает 1%. В крови

триплоидных рыб доля аномалий в строении эритроцитов, наоборот, достаточно высокая (Wlasow et all, 2004). На увеличение аномалий эритроцитов у исследуемых двухлеток могло оказать влияние искусственное гормональное воздействие (Гершанович, 1986). Отметим, что обнаруженные нарушения в крови сеголеток радужной форели вьетнамской (собственной) генерации из рыбоводного хозяйства Клонг-Клань не могут быть обусловлены их триплоидией и, вероятно, связаны, прежде всего, с качеством половых продуктов производителей, технологией их получения, оплодотворения, инкубацией икры и условиями выращивания.



**Рис. 3.** Аномалии эритроцитов в крови радужной форели в возрасте 0 (вьетнамская генерация) (а) и 1+ (американская генерация) (б). а - сегментированное двойное ядро (стрелка); б - амитоз эритроцита (стрелки). Увеличение: ок. 10 об. 100.

### ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Таким образом, по применённым критериям двухлетки радужной форели американского происхождения (поставка икры - «Troutlodge», США) триплоидны. Следующие косвенные факты отражают её триплоидность:

1. Многие половые железы у радужной форели американского происхождения в возрасте 1+ имеют слишком малые размеры для данного возраста рыб (Мурза, Христофоров, 1991), что характеризует задержку их развития.

2. У радужной форели контрольной группы по сравнению с подопытной задержаны сроки дифференцировки и возможного переопределения пола.

3. Гонады радужной форели имеют многочисленные ярко выраженные количественные и качественные (анатомические и цитологические) нарушения, редко встречающиеся в таком количестве у лососевых рыб в норме (Захарова, Чмилевский, 1983; Алёшин, Чмилевский, 1987; Мурза, Христофоров, 1991; Bonnet et all, 2007).

4. Ядерно-плазматическое отношение и диаметр ядер эритроцитов двухлеток радужной форели, выращенных из икры США, достоверно ( $p < 0,001$ ) больше, чем у рыб в возрасте 0+ и 2+, которых мы относим к диплоидам.

5. В крови форели в возрасте 1+ выявлена высокая доля (2,1-9,6%) аномалий в строении эритроцитов, не характерная в норме (Wlasow et al., 2004).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алёшин С.А., Чмилевский Д.А., *Функциональные корреляции процессов формирования фонда половых клеток радужной форели с условиями питания в раннем онтогенезе*, Л. ГосНИОРХ, 1987, Вып 263, с.35-43.
2. Апаликова О.В., *Филогенетический анализ двух форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio* Bloch на основе изменчивости митохондриальной ДНК*, Автореф., диссертации на соискание учёной степени канд. биологических наук, Владивосток, 2008, с.25.
3. Васильев В.П., Лебедева Е.Б., Васильева Е.Д., Левенкова Е.С., Рыскова А.П., *Уникальный диплоидно-тетраплоидный однополо-двуполый комплекс рыб (*Pisces, Cobitidae*)*, ДАН. Т., 2005, 404, №4, с.559-561.
4. Гершанович А.Д., *Пути интенсификации роста рыб при выращивании. Обзорная информация ЦНИИТЭИРХ*, М., 1986, Вып 1, с.1-66.
5. Захарова Н.И., Чмилевский Д.А., *Влияние пониженной температуры на развитие гонад радужной форели (*Salmo gairdneri*)*, Сборник научных трудов ГосНИОРХ, 1983, Вып 203, с.40-46.
6. Лебедева Е.Б., *Структура и распространение клонально-бисексуальных комплексов рыб р. *Cobitis* (*Cobitidae*)*, Автореф. на соиск. учен.степ. к.б. н. Москва, 2007, с.25.
7. Мурза И. Г., Христофоров О. Л., *Определение степени зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атлантического лосося и кумжи*, Ленинград.: Изд. ГосНИОРХ, 1991, с.102.
8. Павлов Е.Д., Ганжа Е.В., НгуенВьет Туи, НгуенТи Хуан Ту, *Состояние половых желёз годовиков триплоидной радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в высокогорных условиях южного Вьетнама при воздействии андрогенного гормона*, 2013.
9. Янкова Н.В., *Эколого-морфологические особенности диплоидно-триплоидных комплексов серебряного карася *Carassius auratus gibelio* Bloch на примере озер междуречья Тобол-Тавда*, Автореф. диссертации на соискание учёной степени канд. биологических наук. Тюмень, 2006, с.23.
10. Bonnet E., Montfort J., Esquerre D., Hugot K., Fostier A., Bobe J., *Effect of photoperiod manipulation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality: A genomic study*, Aquaculture, 2006, V.268, Is.1-4, p.13-22.
11. Dorota F.B., Jankun M., Woznicki P., *Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid Siberian sturgeon *Acipenser baeri* (Brandt)*, Caryologia, 2006, V.59, №4, p.319-321.

12. Gervai J., Peter S., Nagy A., Horvath L., Csanyi V., *Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L.*, J. of Fish Biol., 1980, V. 17, p.667-671.
13. Jankun M., Kuzminski H., Furgala-Selezniow G., *Cytologic ploidy determination in fish - an example of two salmonid species*, Environmental biotechnology, 2007, 3(2):52-56.
14. Thorgaard G. H., *Chromosome set manipulation and sex control in fish*, In Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M., eds. Fish Physiology, 1983, V.9, Reproduction, Part B, Behavior and fertility control. Academic Press, New York, USA, p.405-434.
15. Wlasow T., Kuzminski H., Woznicki P., Ziomek E., *Blood cell alteration in triploid brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill)*, Acta vet. Brno., 2004, №73, p.115-118.
16. Woznicki P., Kuzminski H., *Chromosome numer and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*)*, Caryologia, 2002, 55(4):295-298.

## TÓM TẮT

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU MỨC BỘI THỂ Ở CÁ HỒI VÂN NUÔI TẠI TRẠI CÁ KLONG KLANH, TỈNH LÂM ĐỒNG

Nghiên cứu mức độ bội thể ở cá Hồi vân được ương nở bằng trứng cá nhập từ Mỹ và nuôi tại trại cá Klong Klanh, tỉnh Lâm Đồng. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho phép khẳng định cá Hồi tam bội ở độ tuổi 1+ có kích thước tuyến sinh dục nhỏ hơn so với tuổi của nó, điều này chứng tỏ có sự ức chế quá trình phát triển của tuyến sinh dục. Thực nghiệm cũng cho thấy, có sự phá hủy về cấu tạo tuyến sinh dục, một đặc điểm rất hiếm gặp ở cá Hồi (nói chung).

Trong máu của cá Hồi ở độ tuổi 1+ có 2,1 - 9,6% tế bào hồng cầu có kích thước không bình thường. Bên cạnh đó, tỷ lệ giữa tế bào chất - nhân và đường kính nhân tế bào hồng cầu rất lớn so với cá Hồi lưỡng bội.

*Nhận bài ngày 25 tháng 4 năm 2013*

*Hoàn thiện ngày 15 tháng 9 năm 2013*

<sup>(1)</sup> *Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва*

<sup>(2)</sup> *ПО Тропцентра, Нячанг, СРВ*

<sup>(3)</sup> *Научно-исследовательский институт аквакультуры № 3 - RIA 3, Нячанг*