

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“АЗОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА”
(ФГБНУ «АЗНИИРХ»)**



АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ АКВАКУЛЬТУРЫ В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД

МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

Г. РОСТОВ-НА-ДОНУ

28.09–02.10.2015 Г.

**Ростов-на-Дону
2015**

субпопуляционной структуры вида дают возможность нормализации генетических процессов в популяционной системе за счет заготовки и использования диких производителей.

Исследуемые популяции черноморской кумжи, будучи малочисленными, подвержены высокому риску исчезновения. По этой причине настоятельно требуется реализация мероприятий по сохранению популяции с учётом её генетической дифференциации.

Список литературы

1. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist. 1972. Vol. 106(949). P. 283–292.
2. Peakall R. and Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research// Mol. Ecol. 2006. N. 6. P. 288-295.

GENETIC STRUCTURE OF WILD AND ARTIFICIALLY REARED BLACK SEA TROUT AND ITS ASSESSMENT BASED ON NUCLEAR MARKERS VARIABILITY

N. A. Nebesikhina¹, N.N. Timoshkina¹, E.A. Ivanova¹, A.G. Lepeshkov¹, Tuniev S.B.²

¹*Russian Federal Azov Fisheries Research Institute, Rostov-on-Don, nebo_N_71@mail.ru*

²*Sochi National Park, Sochi*

Based on variability of nine microsatellite loci we have studied the genetic structure of natural populations of Black Sea trout and the fish of the same species held as a broodstock at the fish-breeding farm. When comparing the frequency distribution of alleles in the fish samples, we have revealed a significant difference in all the loci studied, which indicates their genetic structure to be considerable.

УДК 594.124:543.645.2 (262.5)

КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБЩЕГО ТЕСТОСТЕРОНА В ГОНАДАХ И ПОЛОВЫХ ПРОДУКТАХ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

Л.Л. Никонова, М.В. Нехорошев

Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского, г. Севастополь, Россия
lar_sa1980@mail.ru, mnekhroshev@gmail.com

Описано количественное содержание общего тестостерона в гонадах и половых продуктах черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в течение репродуктивного цикла. В репродуктивной системе черноморской мидии отмечены колебания концентрации общего тестостерона. В гонадах мидий этот показатель зависит от пола и стадии зрелости. Высокие концентрации общего тестостерона наблюдаются в гонадах мидии на первой и второй стадиях репродуктивного цикла. Концентрация общего тестостерона в течение полового цикла в мужских гонадах значительно выше, чем в женских. В женских половых продуктах - яйцеклетках концентрация тестостерона составила 10 пг/г в пересчете на сухую массу. В сперматозоидах концентрация общего тестостерона в пересчете на сухую массу составила 14284.8 пг/г. Ключевые слова: черноморская мидия, гонады, половые продукты, общий тестостерон, свободный тестостерон, иммуноферментный анализ.

Гормон тестостерон, обладая высокой физиологической активностью, является стимулятором роста позвоночных животных и гидробионтов, отвечает за нормальное развитие и функционирование половой системы (созревание гонад, необходимые структурные и биохимические изменения в репродуктивных органах) [2]. В гонадах черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. обнаружен тестостерон, но его количественное содержание в зависимости от стадии полового созревания и в половых продуктах не изучены. Учитывая значимость тестостерона в регуляции основных жизненных функций в органах черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. теоретическая актуальность этой проблемы существенно дополняется практическим значением черноморской мидии, являющейся ценным объектом марикультуры. Цель работы заключалась в количественном определении концентрации общего тестостерона в гонадах *Mytilus galloprovincialis* на разных стадиях полового созревания и в половых продуктах (яйцеклетках и сперматозоидах) и в оценке соотношения концентраций общего тестостерона в гонадах до и после нереста и в половых продуктах. Общий тестостерон представлен в организме в двух фракциях: тестостерон в несвязанном состоянии - свободный тестостерон, составляющий 1 - 2 % от общего тестостерона и являющийся биоактивной формой, т.е. оказывающий действие на клетки и

тестостерон, связанный с белками. Связанный тестостерон в свою очередь подразделяется на две группы: сильно связанный с белком - неактивная форма тестостерона, его функция заключается в связке половых гормонов (составляет более 60% от общего тестостерона) и менее связанный с белком альбумином, являющийся биоактивной формой тестостерона. При этом решались следующие задачи: выделение тестостероновой фракции из гонад и половых продуктов (яйцеклеток и сперматозоидов) черноморской мидии на разных стадиях полового цикла и количественное определение концентрации общего тестостерона методом иммуноферментного анализа.

Материал и методы. Для исследований выбрали черноморскую мидию *Mytilus galloprovincialis* Lam. Отбор проб проводили раз в квартал в период с 2012 по 2014 год. Моллюсков с длиной створок 50 - 60 мм отбирали с фермы, расположенной в бухте "Ласпи", находящейся в 40 км восточнее Севастополя, с глубины 2 м. Всего было проанализировано 160 моллюсков. В соответствии с литературными данными [7,8] выделяли пять стадий репродуктивного цикла. Принадлежность особи к той или иной стадии определяли на свежих мазках под микроскопом по комплексу признаков, характерных для данной стадии [6,7]. Мидии на одной репродуктивной стадии разделяли на пять параллельных групп, в каждую из которых входило по одному моллюску. Для сбора половых продуктов и температурной стимуляции нереста предварительно охлажденные до температуры 18 °С мидии рассаживали по 1 экземпляру в пластмассовые стаканы емкостью 0,5 л с фильтрованной через марлю водой, поддерживая температуру 23 °С [4]. Яйцеклетки в процессе нереста оседали на дно в виде осадка желто - оранжевого цвета, сперматозоиды образовывали белое облако и тоже оседали на дно. Воду над осадком сливали, взвесь половых клеток переносили в центрифужные пробирки при помощи дозатора "Labsystems" и центрифугировали ($g = 1900$), чтобы сконцентрировать половые продукты и не повредить оболочки половых клеток. В результате получали чистый однородный осадок яйцеклеток и сперматозоидов.

Для количественного определения общего тестостерона у черноморской мидии выделяли гонады (или отбирали дозатором суспензию половых продуктов) - в каждой пробе по одной гонаде (суспензия яйцеклеток или сперматозоидов от одной особи), гомогенизировали и взвешивали на аналитических весах с точностью до четвертого знака. Далее определяли сухой вес гонад (половых продуктов) методом высушивания аликвотной пробы объемом 1 мл до постоянного веса. Массу гонад (половых продуктов) в пересчете на сухое вещество рассчитывали, зная разность между сырой массой аликвотной пробы гомогенизированных гонад (суспензии половых продуктов) объемом 1 мл, и массой аликвотной пробы гомогенизированных гонад (суспензии половых продуктов) после усушки. Гомогенизированные гонады и половые продукты (яйцеклетки и сперматозоиды) от каждой исследуемой особи растворяли в минимальном количестве спирто - хлороформенной смеси и центрифугировали с помощью центрифуги типа "СМ - 6М" (Санкт - Петербург), $g = 9000$. Надосадочную жидкость отправляли на иммуноферментный анализ для количественного определения общего тестостерона. Концентрацию общего тестостерона в гонадах и половых продуктах определяли с помощью иммуноферментного анализатора типа "Shorus" (Италия) при помощи набора для иммуноферментного анализа, произведенного в Германии (фирма DRG), на длине волны 450 нм. Для анализа использовали 1 мл образца суспензии гонад (половых продуктов). Так как концентрации стандарта тестостерона для иммуноферментного анализа были равны: 0 - 0.2 - 0.5 - 1 - 2 - 6 - 16 нг/мл (1 нг/мл = 3.467 нмоль/л) и показания снимались в нмоль/л, возникла необходимость пересчета показаний прибора в пг/г сухого веса гонад. Для этого измеренную концентрацию в нмоль/л пропорционально переводили в нг/мл, зная, что 1 нг/мл = 3.467 нмоль/л. Далее нг/мл переводили в пг/мл. Зная массу сухого веса гонад в 1 мл суспензии гонад (половых продуктов) пересчитывали концентрацию на 1 г сухого веса гонад.

Результаты и обсуждение. Материалы по содержанию общего тестостерона в гонадах и половых продуктах мидий представлены в таблице 1, в пикограммах на 1 грамм сухой массы.

Концентрация общего тестостерона у мужских особей значительно выше, чем у женских. Максимальная концентрация общего тестостерона у мужских и у женских особей наблюдается

на первой стадии полового созревания, затем снижается до минимума к третьей стадии, начиная возрастать к периоду нереста. После нереста концентрация общего тестостерона в гонадах снижается, а к первой стадии зрелости резко возрастает. Впервые определена концентрация общего тестостерона в яйцеклетках и сперматозоидах черноморской мидии. Концентрация общего тестостерона в сперматозоидах значительно выше, чем в яйцеклетках. Такая же закономерность наблюдается в системе "гонады - половые продукты". В сперматозоидах концентрация общего тестостерона превышает его концентрацию в гонадах в два раза. В гонадах самок черноморской мидии максимальная концентрация общего тестостерона наблюдается на первой и второй стадиях зрелости 2154.53 пг/г и 592.13 пг/г. Концентрация общего тестостерона в гонадах самок на пятой стадии зрелости до нереста в пересчете на 1 г сухой массы гонад существенно не отличается от концентрации общего тестостерона в гонадах самцов на этой же стадии зрелости: 859 пг/г и 975.1 пг/г. После нереста наблюдается видимое отличие в концентрациях общего тестостерона у самцов и самок: 692.17 пг/г и 144.2 пг/г. В [5] приведены данные о содержании тестостерона в гонадах самок черноморской мидии без разделения по стадиям полового созревания, концентрация тестостерона оказалась равной 0.6 ± 0.04 пм/г или 172.8 ± 11.52 пг/г. Следует отметить, что для самцов автор указала концентрацию 0.3 ± 0.04 пм/г или 86.43 ± 11.52 пг/г, т.е. в два раза меньше, чем у самок. Результаты наших исследований показали, что в гонадах самцов черноморской мидии на четвертой стадии зрелости концентрация общего тестостерона составила 979.02 пг/г, на пятой стадии до нереста концентрация общего тестостерона в пересчете на 1 г сухого веса гонад составила 975.01 пг/г, а на пятой стадии после нереста - 692.17 пг/г. В тезисах [3] приведены данные о содержании тестостерона в теле самок интактных мидий в пределах 1.01 - 0.1 пмоль/г тела или 28.8 - 290.88 пг/г. В наших исследованиях такое количество общего тестостерона соответствует третьей стадии зрелости мидий. В теле самцов интактных мидий [3] тестостерон находился в пределах 0.9 - 1.7 пмоль/г (259.2 - 489.6 пг/г). Согласно полученным нами данным концентрация общего тестостерона в гонадах самцов черноморской мидии в пересчете на 1 г сухой массы гонад была намного выше и варьировала от 692.17 пг/г до 7757.77 пг/г. В современной литературе подробно описана концентрация свободного тестостерона в мужских и женских гонадах двухстворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* [8] и составляет у самок и самцов 18.7 пг/г и 80.6 пг/г, учитывая, что свободный тестостерон в теле самок составляет 1 % от концентрации общего, а в теле самцов - 2 %, концентрация общего тестостерона в мужских и женских гонадах *Sinonovacula constricta* составляет 1870 пг/г и 8060 пг/г.

Таблица 1

Содержание общего тестостерона в гонадах и половых продуктах черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в зависимости от пола и стадии полового созревания

Стадии зрелости гонад (половые продукты)	Концентрация общего тестостерона в пересчете на 1 г сухого веса гонад (половых продуктов), пг/г	
	Самцы	Самки
1	7757.8 ± 2315.2	2154.5 ± 643.1
2	2453.1 ± 1409.8	592.1 ± 112.8
3	781.1 ± 60.1	210.3 ± 30.0
4	979.0 ± 83.9	352.0 ± 192.0
5 до нереста	975.1 ± 464.3	859.0 ± 116.1
5 после нереста	692.2 ± 115.4	144.2 ± 14.4
Яйцеклетки		10.1 ± 4.8
Сперматозоиды	14284.8 ± 259.2	

В женских гонадах двухстворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* [8] в пересчете на сухой вес максимальная концентрация свободного тестостерона была обнаружена в июне

(4, 5 стадия) - 66.5 пг/г (6650 пг/г общего тестостерона) и в июле (4,5 стадия) - 80.6 пг/г (8060 пг/г общего тестостерона). Минимальный уровень свободного тестостерона в женских гонадах двухстворчатого моллюска *Sinonovacula constricta* [8] в пересчете на сухой вес приходился на январь (3 стадия) и составил 18.7 пг/г (1870 пг/г общего тестостерона). В полученных нами данных концентрация общего тестостерона в гонадах самок черноморской мидии в пересчете на 1 г сухого веса гонад на третьей стадии зрелости не превышала 859 пг/г. Концентрация общего тестостерона в гонадах самцов *Sinonovacula constricta* [8] варьировала от 2555 пг/г до 4030 пг/г. В полученных нами данных концентрация общего тестостерона в гонадах самцов черноморской мидии находилась в пределах от 692.17 до 7757.77 пг/г. Концентрация общего тестостерона в гонадах до нереста выше, чем после нереста: 975.1 и 692.17 пг/г. В нашей работе впервые была измерена концентрация общего тестостерона в половых продуктах (яйцеклетках и сперматозоидах) черноморской мидии. В яйцеклетках концентрация общего тестостерона оказалась значительно ниже, чем в сперматозоидах: 10 пг/г и 14284.8 пг/г.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание общего тестостерона в гонадах черноморской мидии зависит от половой принадлежности и от стадии полового созревания. В мужских и женских гонадах черноморской мидии были определены концентрации общего тестостерона в пересчете на 1 г сухой массы гонад по стадиям зрелости. В гонадах черноморской мидии происходит снижение уровня общего тестостерона по мере созревания. Для всех исследованных гонад характерна общая тенденция к увеличению уровня общего тестостерона после завершения нереста. Впервые была определена концентрация общего тестостерона в половых продуктах (яйцеклетках и сперматозоидах) черноморской мидии в пересчете на 1 г сухого веса половых продуктов. В яйцеклетках концентрация общего тестостерона оказалась значительно ниже, чем в сперматозоидах: 10 пг/г и 14284.8 пг/г соответственно

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность Пирковой А.В., Поспеловой Н.В., Караванцевой Н.В., Никитиной С.М., Кудикиной Н.П. за ценные советы и замечания, сделанные в процессе подготовки статьи.

Список литературы

1. Гегер Ш. Количественный анализ стероидов. - М.: Изд - во Мир, 1985. - 207 с.
2. Никитина С.М. Стероидные гормоны беспозвоночных животных. - Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982.- 172 с.
3. Ежова Е.Е., Никитина С.М. Влияние гидрокортизона и тестостерона на нейросекрецию и гаметогенез черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Тезисы конференции в Петрозаводске.
4. Караванцева Н.В., Поспелова Н.В., Бобко Н.И. Методика отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Системы контроля окружающей среды.- 2012. - вып. 17.- С. 184 - 187.
5. Кудикина Н. П. Экологические аспекты динамики стероидных гормонов в репродуктивном цикле морских двустворчатых, брюхоногих и головоногих моллюсков // Уч. записки Казанского ун - та. - 2007. - 9, № 3. - С. 214 - 224.
6. Пиркова А.В. Размножение мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. и элементы биотехнологии ее культивирования: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Севастополь., 1994.- 25 с.
7. Пиркова А.В., Н.Г. Столбова, Л.В. Ладыгина. Сезонная динамика нереста мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. в иловых поселениях разных районов Черного моря // Гидробиол. журн. - 1994. - 30, вып. 2. - С. 22 - 27
8. Hongwei Yan, Qi Liwenguang Liu, Qiaozhen Ke Ruihai YU. Seasons changes of estradiol and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) // Journal Molluscan Studies. - 2011. - C. 116 - 122

CONCENTRATIONS OF TOTAL TESTOSTERONE IN THE GONADS AND REPRODUCTIVE PRODUCTS BLACK SEA MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

L.L. Nikonova, M.V. Nekhoroshev

Described the quantitative content of total testosterone in the gonads and sex products Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. during the reproductive cycle. In the reproductive system of the Black Sea mussels marked fluctuations in the concentration of total testosterone. In the gonads of mussels, this figure depends on the sex and stage of maturity. High concentrations of total testosterone in gonads mussels observed at the first and second stages of the reproductive cycle. The concentration of total testosterone during the sexual cycle in the male gonads significantly higher than in women. In the female genital products - oocytes testosterone concentration was 10 pg / g dry weight. As sperm concentration of total testosterone in dry weight was 14284.8 pg / g. Key words: Mediterranean mussel, gonads, sex products, total testosterone, free testosterone, enzyme immunoassay.