

ЖИВОТНОВОДСТВО И ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА 2017 №4 (27)

УДК 639.303.45

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПО ВНЕШНИМ МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ

Н. В. БАРУЛИН

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Могилевская область, Республика Беларусь, 213407

(Поступила в редакцию 20.09.2017)

Резюме. Цель настоящей работы заключалась в исследовании морфологического строения жучек стерляди и выявлении его зависимости от пола, а также в разработке системы прижизненного определения пола стерляди. Исследовано ремонтно-маточное стадо стерляди волжской популяции *Acipenser ruthenus*, в возрасте 3 года, с гонадами второй стадии зрелости. Выращивание осуществлялось в условиях установки замкнутого водоснабжения при средней температуре воды 16 ± 2 °C без создания условий зимовки. Впервые установлено, что спинные жучки созревающей стерляди имеют достоверные морфологические отличия, зависящие от пола. Разработана система определения пола, использующая первые пять жучек, основанная на балльной оценке выраженности отдельных признаков жучек. Полученные результаты перспективны для разработки способа прижизненной идентификации пола представителей *Acipenseridae* на ранних стадиях гаметогенеза.

Ключевые слова: стерлядь, пол, ремонтно-маточное стадо, спинные жучки, гаметогенез.

Summary. The goal of this research was to study sterlet scute morphology and reveal the relationship between it and sterlet sex as well as develop a method of intra-vitam sterlet sex determination. We studied replacement brood stock of sterlet from Volga population *Acipenser ruthenus* aged 3 years with gonads at the second maturation stage. The sterlet were bred in RAS systems at mean water temperature 16 ± 2 °C without creating conditions for wintering. It was for the first time established that dorsal scutes of maturing sterlet had statistically significant morphological differences depending on sex. We developed a system of sex determination using the first five scutes and appraisal by points of expression of particular scute characteristics. The findings have potential as a method of intra-vitam sex determination in *Acipenseridae* representatives at the early stages of gametogenesis.

Key words: sterlet, sex, replacement brood stock, dorsal scutes, gametogenesis.

Введение. До настоящего времени у осетровых выраженный половой диморфизм по морфологическим признакам не обнаружен, даже в период полового созревания, в отличие, к примеру, от лососевых рыб, у которых возможно определить пол по внешним признакам, например, по форме анального плавника [2].

В настоящее время многие исследователи предпринимают попытки разработать метод ранней идентификации пола осетровых. Однако универсальных методов еще не разработано. Методы биопсии и лапароскопии травмируют рыбу [18, 20]. Ультразвуковой (УЗИ) и эндоскопический методы используются при относительно позднем возрасте [8, 9, 19]. Биохимические [16], гормональные [4, 12] и генетические методы [14], а также метод инфракрасной спектроскопии [11] трудны и дороги.

На возможность определения пола у русского осетра *A. gueldenstaedtii* с использованием биометрических методов указывали в своей работе Мальцев и Маркулов [3]. Однако эти методы не были разработаны в полной мере и, несмотря на простоту применения, они не могут быть рекомендованы для широкого использования в аквакультуре [8]. Различия в форме грудных плавников у одомашненных особей амурского осетра *A. schrenkii* были отмечены Подушкой [5], однако они не установлены для дикого амурского осетра. Установлены половые различия по форме уrogenитального отверстия у белого *A. transmontanus*, атлантического *A. oxyrinchus* и короткорылового *A. brevirostrum* осетров [7]. Однако этот метод был подвергнут сомнению в связи с отсутствием достоверных отличий у других видов осетровых [8, 18].

По нашему мнению, несмотря на сложившейся скептицизм к попыткам найти внешние морфологические половые различия у осетровых, такие исследования должны продолжаться.

Нами впервые обнаружено, что спинные жучки стерляди *Acipenser ruthenus*, имеют особенности строения, связанные с полом, что дает возможность разработки метода прижизненной идентификации пола стерляди и других осетровых.

Цель работы – исследование морфологического строения спинных жучек стерляди и выявлении связи их строения с полом; а также разработка прижизненного метода определения пола стерляди.

Материал и методика исследований. Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства и рыбоводного индустриального комплекса Белорусской государственной сельскохозяйственной академии (г. Горки, Могилевская область, Республика Беларусь) в 2015–2016 гг. В исследованиях использовали стерлядь волжской популяции в возрасте 3 года. Средняя масса $1,82 \pm 0,12$ кг, средняя длина $61,2 \pm 1,3$ см. Статистически достоверных отличий между массой и длиной самцов и самок не наблюдалось. Для исследований отбирались особи с гонадами на второй стадии зрелости по шкале Трусова [6]. Для определения пола у стерляди использовали метод УЗИ-диагностики на портативном сканере Mindray DP-6600, с последующим определением пола у умерщвленных особей. В сложных случаях образцы гонад отправлялись на гистологические исследования. У умерщвленных экземпляров срезали спинные жучки от головы до начала спинного плавника. Первая спинная жучка, плотно прилегающая к костным пластинкам черепа не срезалась. Принцип нумерации спинных костных пластин, используемых в наших исследованиях, представлен (рис. 1). После среза спинные жучки подвергались варке, чистке, мойке и фотографированию на камеру Canon EOS 500D.

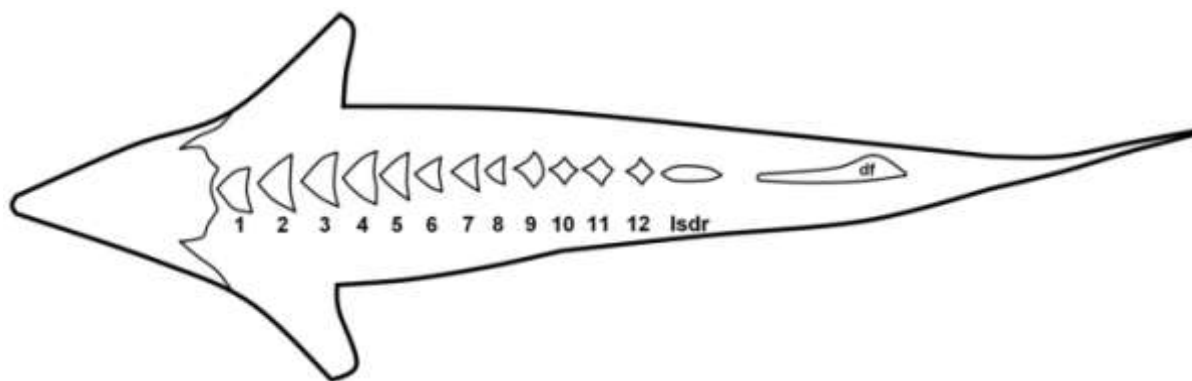


Рис. 1. Схема нумерации спинных жучек стерляди (df – спинной плавник, dorsalfin; lsdr – последняя спинная пластинка, last scute of dorsal row)

Полученные изображения подвергались измерению в программе ImageJ с использованием инструментов «Straight Line», «Polygon selections», «Elliptical selections» при помощи графического планшета Trust Canvas Widescreen Tablet. В процессе изучения жучек выполнялись следующие промеры: длина жучки; ширина жучки; длина левой и правой лопасти; площадь жучки; площадь условного круга, в который помещалась жучка; длина максимального зубца жучки; ширина основания максимального зубца; количество зубцов. Диаметр условного круга, в который помещалась жучка, равнялся ее ширине или длине, в зависимости от удаления жучки от головы (или ее номера). По полученным измерениям рассчитывались относительные коэффициенты.

Для статистической обработки результатов использовали программную среду R [17], включая пакеты R Commander, PMCMR, MASS, corrplot и др. Статистическую достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при условии соблюдения нормальности распределения данных (оценивалось тестом Шапиро-Уилка) и однородности групповых дисперсий (оценивалось тестом Ливина). При несоблюдении указанных условий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни (для двух исследуемых групп). Для оценки качественных признаков использовали критерий χ^2 («хи-квадрат»). Нами было исследовано 510 спинных жучек от 42 экземпляров стерляди.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами было установлено, что между жучками самцов и самок стерляди имеется множество статистических достоверных различий. Однако различия по абсолютным значениям промеров имеют место только при сравнении рыб одного возраста и размера, в противном случае различия в размерах рыб будут приводить к ошибкам в диагностике пола. Поэтому для точной диагностики пола пригодны относительные значения признаков (коэффициенты): отношение ширины жучки к ее длине (коэффициент Ш/Д), отношение

средней длины левой и правой лопасти жучки к ее общей длине (коэффициент Дл/Д), отношение площади жучки к площади условного круга, в который она помещалась (коэффициент заполнения), отношение длины максимального зубца к ширине жучки (коэффициент Дз/Ш), отношение длины максимального зубца к ширине основания максимального зубца (коэффициент Дз/Шз). Влияние размеров рыб на эти коэффициенты незначительно. К этим относительным параметрам также следует отнести количество зубцов по краям жучки. Изменения указанных относительных параметров в зависимости от пола и номера спинной жучки представлена подробное представлено в нашей предыдущей работе [1].

Анализ спинных жучек по группирующим (качественным) критериям. На основании результатов относительных значений морфологических признаков были составлены критерии для визуальной прижизненной диагностики пола стерляди:

1. Отношение ширины спинной жучки к длине (критерий составлен на основании результатов коэффициента Ш/Д): ширина выглядит значительно больше длины или ширина и длина выглядят одинаковыми / длина больше ширины.

2. Форма жучки (критерий составлен на основании результатов коэффициента Дл/Д и коэффициента заполнения): жучка выглядит сплюсненной / овальной или жучка выглядит вытянутой / округленной.

3. Заостренность зубцов (критерий составлен на основании результатов коэффициента Дз/Шз: зубцы выглядят заостренными или зубцы выглядят закругленными.

4. Удлиненность зубцов относительно ширины (критерий составлен на основании результатов коэффициента Дз/Ш): зубцы относительно ширины жучки визуально удлинены значительно или зубцы относительно ширины жучки визуально не удлинены.

Отметим, что такой признак жучек самцов, как количество зубцов в ходе прижизненной диагностики пола трудно применим, т. к. подсчет зубцов занимает большое время. Поэтому данный признак можно условно отнести к третьим и четвертым группирующим (качественным) критериям, т. к. если зубцов много, то они значительно заметнее).

Анализ применения критерия № 1. Для статистического анализа использования данного критерия мы применили таблицы сопряженности (2x2) критерия χ^2 (хи-квадрат), в которую внесли признаки первого группирующего (качественного) критерия при оценке жучек самцов и самок стерляди. Из всех исследуемых жучек признак рассматриваемого критерия – «Ширина выглядит значительно больше длины» встречался у 153 шт. пластинок самцов (46,6 % от всех спинных жучек самцов) и у 32 шт. пластинок самок (21,6 % от всех спинных жучек самок). Вариант критерия – «Ширина и длина выглядят одинаковыми или длина больше ширины» встречался у 198 шт. жучек самцов (56,4 % от всех пластинок самцов) и 116 шт. пластинок самок (78,4 % от всех пластинок самок). Значение Хи-кватрат – 21,54 ($p = 0,00001$). Анализируя каждую спинную костную пластинку в отдельности по критерию «Визуальное отношение ширины спинной жучки к длине», было установлено, что признак «Ширина выглядит значительно больше длины» статистически достоверно характерен чаще всего для первых двух жучек самцов (уровень статистической достоверности данного утверждения $p < 0,05$).

Анализ применения критерия № 2. Из всех исследуемых жучек признак рассматриваемого критерия – «Спинная жучка выглядит сплюсненной, овальной» встречался у 102 шт. пластинок самцов (29,1 % от всех жучек самцов) и у 11 шт. пластинок самок (7,3 % от всех жучек самок). Вариант критерия – «Спинная жучка выглядит вытянутой округленной» встречался у 248 шт. пластинок самцов (70,9 % от всех жучек самцов) и 139 шт. жучек самок (92,7 % от всех жучек самок). Значение Хи-кватрат – 28,55 ($p = 0,00001$). Анализируя каждую спинную жучку в отдельности по критерию «Визуальная форма жучки», было установлено, что признак «Спинная жучка выглядит сплюсненной, овальной» статистически достоверно характерен чаще всего для первых трех жучек самцов.

Анализ применения критерия № 3. Из всех исследуемых жучек признак рассматриваемого критерия – «Зубцы выглядят заостренными» встречался у 355 шт. жучек самцов (93,9 % от всех жучек самцов) и у 63 шт. жучек самок (39,1 % от всех жучек самок). Вариант критерия – «Зубцы выглядят закругленными» встречался у 23 шт. жучек самцов (6,1 % от всех жучек самцов) и 98 шт. жучек самок (60,9 % от всех жучек самок). Значение Хи-кватрат – 194,6 ($p = 0,00001$). Анализируя каждую спинную жучку в отдельности по критерию «Визуальная заостренность зубцов», было установлено, что признак «Зубцы выглядят заостренными» статистически достоверно встречаются для первых девяти жучек самцов.

Анализ применения критерия № 4. Из всех исследуемых жучек признак рассматриваемого критерия – «Зубцы относительно ширины спинной жучки удлинены значительно» встречался у 325 шт. жучек самцов (86,0 % от всех спинных жучек самцов) и у 49 шт. жучек самок (30,4 % от всех спинных жучек самок). Вариант критерия – «Зубцы относительно ширины спинной жучки удлинены незначительно» встречался у 53 шт. жучек самцов (14,0 % от всех спинных жучек самцов) и 112 шт. жучек самок (69,6 % от всех спинных жучек самок). Значение Хи-кватрат – 163,99 ($p = 0,00001$). Анализируя каждую спинную жучку в отдельности по критерию «Визуальная удлиненность зубцов относительно ширины спинной жучки», было установлено, что признак «Зубцы относительно ширины спинной жучки удлинены значительно» статистически достоверно наиболее ярко выражен у первых шести жучек самцов.

Разработка системы определения пола. Как показал статистический анализ с применением таблиц сопряженности (2x2) критерия χ^2 (хи-квадрат), наиболее вероятные статистические различия по рассматриваемым критериям между самцами и самками стерляди приходится в среднем на первые пять – шесть спинных жучек. На основании этого была разработана система определения пола стерляди по спинным жучкам с целью идентификация самцов. Данная система включала в себя основные вышеназванные критерии. Апробация системы показала, что ее удобно применять на очищенных жучках, извлеченных из кожи, или если такие жучки значительно выделяются на коже. В ходе практического применения системы трудно использовать сразу четыре параметра. Поэтому нами были объединены критерии, характеризующие форму жучки, и критерии характеризующие зубцы жучки. На основании такого объединения нами была разработана оптимизированная система определения пола стерляди по спинным жучкам. Она включала в себя два основных критерия. За соответствие мужским вариантам критерия предлагалось начислять один балл. Как и расширенную систему, разработанную оптимизированную систему определения пола целесообразно использовать на первых пяти спинных жучках. Оптимизированная система идентификации пола стерляди представлена в табл. 1, а пример ее использования представлен на рис. 2. Нами была проведена апробация оптимизированной системы определения пола на живых особях стерляди, пол которых был заранее известен (табл. 2). Анализируя представленные в таблице данные, обратим внимание, что в результате апробации системы, включающей 2 критерия, среднее количество баллов, которые получали самцы, составило $7,0 \pm 0,6$ (5–10), среднее количество баллов, которые получали самки, составило $2,0 \pm 0,3$ (0–4). Наблюдаемые различия были статистически достоверными.

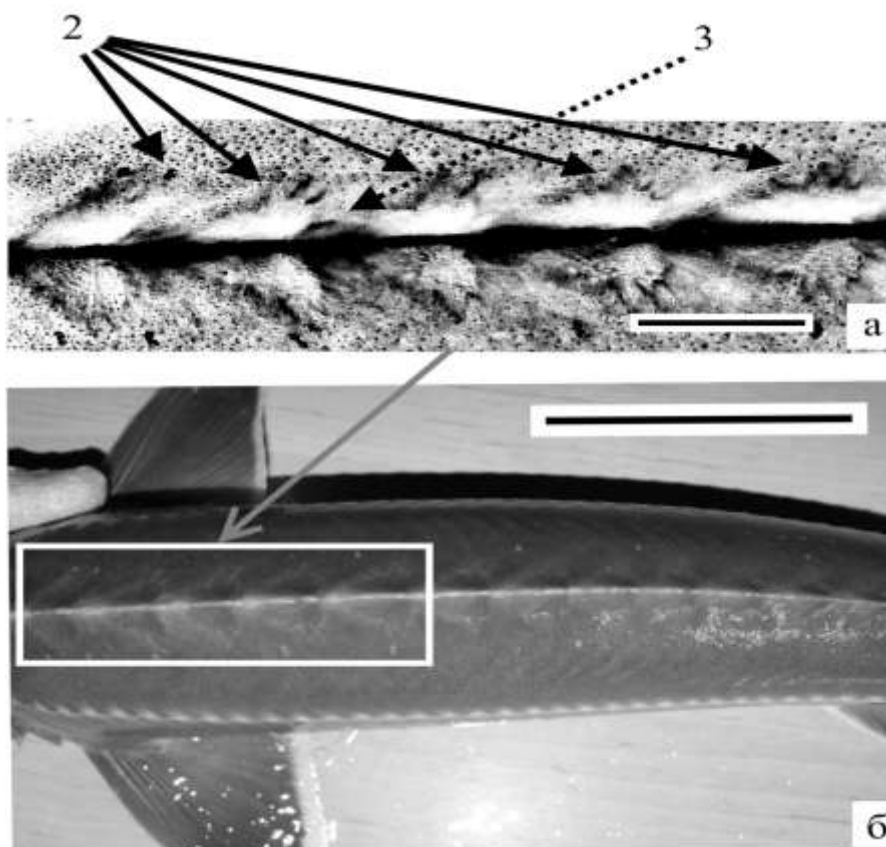


Рис. 2 (начало)

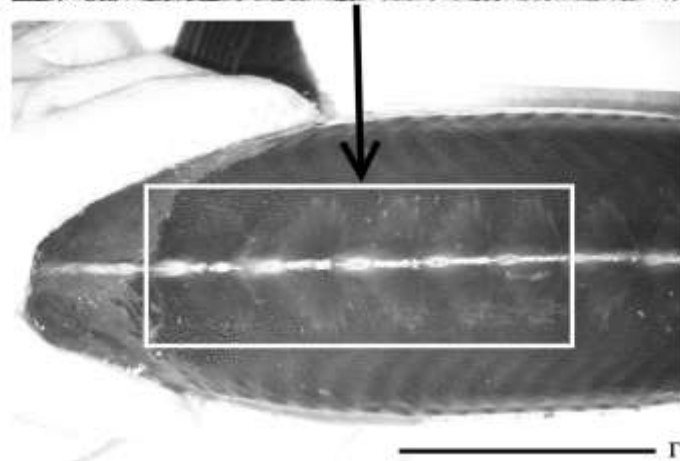
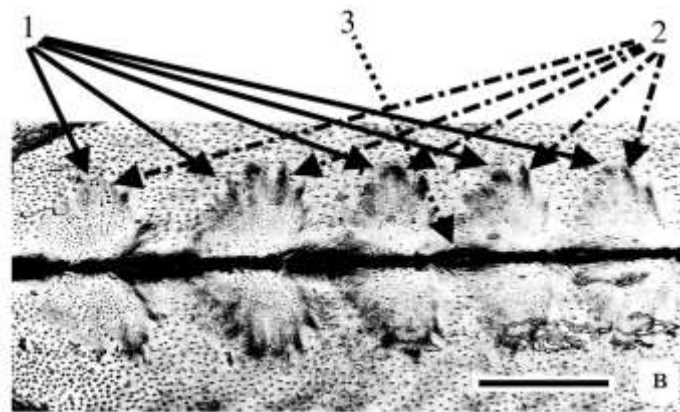


Рис. 2 (продолжение)

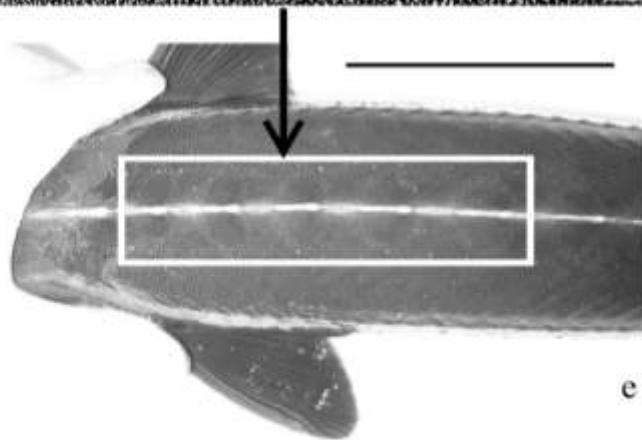
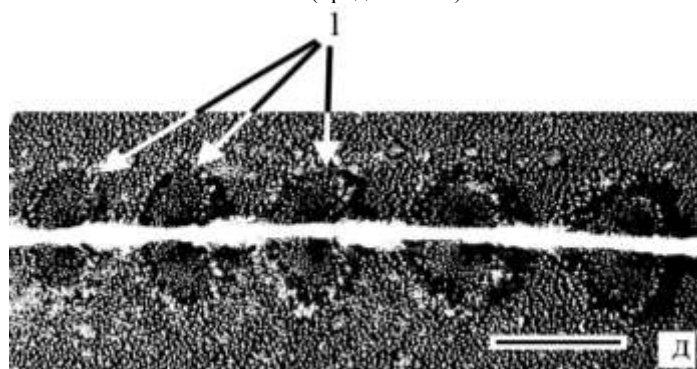


Рис. 2 (продолжение)

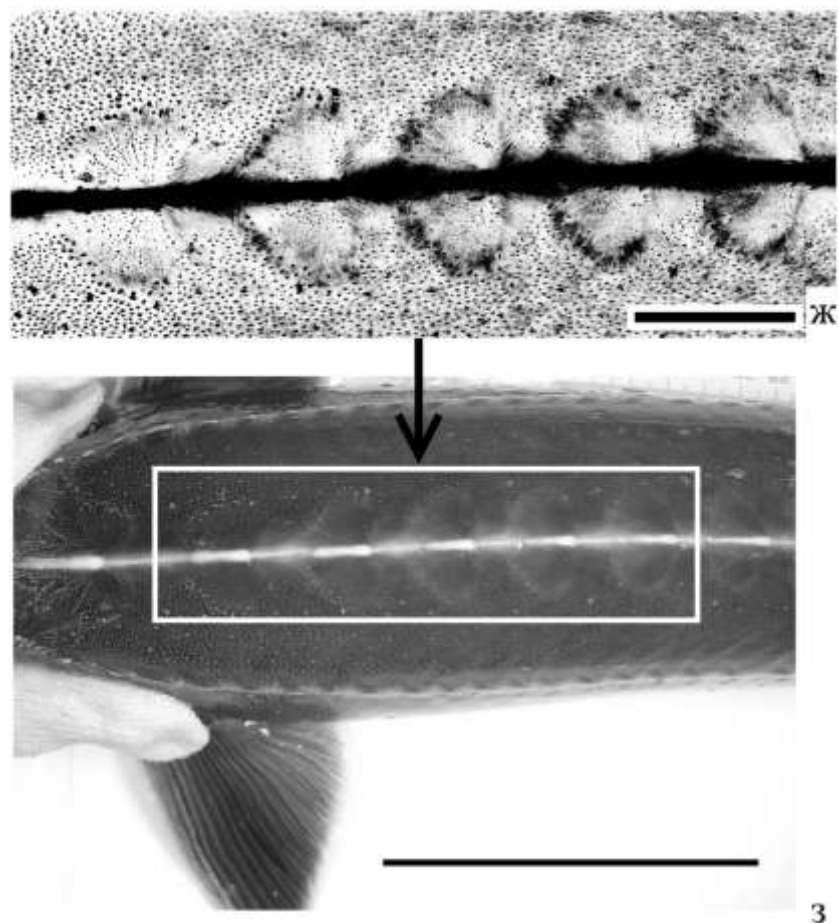


Рис. 2. Пример начисления баллов при использовании оптимизированной системы определения пола на первых пяти жучках стерляди в процессе бонитировки: *а-б* – самец № 1, 6 баллов (критерий 1–0 баллов, критерий 2–5 баллов, критерий 3–1 балл); *в-г* – самец № 2, 11 баллов (соответственно 5, 5 и 1 балл); *д-е* – самка № 1, 3 балла (критерий 1–3 балла, критерии 2 и 3–0 баллов); *ж-з* – самка № 2, 0 баллов. Критерии (вариант признака, при котором начисляется 1 балл):

1 – визуальная форма спинной жучки (овальная); 2 – визуальная форма зубцов (острые и удлиненные); 3 – расстояние между спинными жучками (менее $\frac{1}{2}$ средней ширины лопасти жучки). Для улучшения визуализации использовали инвертирование цветов в программе ImageJ (*а, в, д, ж*). Масштаб: *а, в, д, ж* – 3 см; *б, г, е, з* – 10 см

Т а б л и ц а 1. Оптимизированная система определения пола стерляди, направленная на идентификацию самцов

Название критерия	Вариант критерия	Количество баллов за соответствие критерию
Визуальная форма спинной жучки	Спинная жучка сплюснутая, овальная	1
	Спинная жучка вытянутая, округленная	0
Визуальная заостренность зубцов	Зубцы острые и удлиненные	1
	Зубцы короткие, закругленные или не идентифицируются	0

Т а б л и ц а 2. Результаты апробации оптимизированной системы определения пола по спинным жучкам на живых особях стерляди с заранее известным полом

Пол	Mean±SE, баллы	Max.	Min.	n	Тест Шапиро-Уилка	F-тест	Тест Стьюдента
Самец	7,0±0,6	10	5	20	p>0,05	p>0,05	p<0,05
Самка	2,0±0,3	4	0	20			

Заключение. Нами впервые установлено, что спинные жучки половозрелой стерляди имеют достоверные морфологические отличия, зависящие от пола. Для оценки морфологического строения спинных жучек предлагается определять две группы показателей, характеризующих форму пластинки, а также строение их зубцов. У самцов стерляди спинные жучки более вытянуты в ширину, имеют более сплюснутую форму, а также имеют более длинные и заостренные зубцы, число которых больше, чем у самок. На основании анализа спинных жучек по группирующим (качественным) критериям нами была разработана расширенная, а затем оптимизированная системы определения пола. В конечном варианте в рамках оптимизированной системы определения пола предлагается визуально оценивать спинные жучки по их форме, а также по заостренности зубцов с зачислением соответствующих баллов.

Остается открытым вопрос о существовании сходных закономерностей в строении спинных жучек у стерляди более раннего возраста. Как показали исследования Вюртца с соавторами (Wuertz et al., 2011), у личинок европейского и атлантического осетров имеются различия в строении жучек, которые, как показали исследования Тиерена с соавторами (Thieren et al., 2015), а также Дезе-Берсе и Вийо (Desse-Berset, Williot, 2011), сохраняются у половозрелых особей. Это позволяет нам надеяться на положительный результат в разработке способа идентификации пола стерляди и других видов осетровых рыб на более ранних стадиях онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барулин, Н. В. Строение спинных костных пластинок взрослой стерляди в зависимости от пола / Н. В. Барулин // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2016. – № 4(23). – С. 8–18.
2. Животовский, Л. А. Морфологические маркеры пола у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmonidae) / Л. А. Животовский, Х. Ю. Ким // Вопросы ихтиологии. – 2015. – Т. 55. – № 1. – С. 107–109.
3. Мальцев, А. В. Биометрический метод определения пола осетровых, в частности русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae) азовской популяции / А. В. Мальцев, Я. Г. Меркулов // Вопросы ихтиологии. – 2016. – Т. 46. – № 4. – С. 536–540.
4. Мосягина, М. В. Состояние стероидсекреторных клеток и концентрация половых стероидных гормонов в плазме крови сибирского осетра *Acipenser baerii* и стерляди *A. ruthenus* (Acipenseridae) в период дифференцировки пола / М. В. Мосягина, О. В. Зеленников // Вопросы ихтиологии. – 2016. – Т. 56. – № 1. – С. 95–101.
5. Подушка, С. Б. Половые различия в форме парных плавников у амурского осетра / С. Б. Подушка // Осетровое хозяйство. – 2008. – В. 2. – С. 69–71.
6. Трусов, В. З. Метод определения степени зрелости половых желез самок осетровых / В. З. Трусов // Рыбное хозяйство. – 1964. – Т. 1. – С. 26–28.
7. A noninvasive technique for determining sex of live adult North American sturgeons / P. Vecsei [et al.] // Environ. Biol. Fishes. – 2003. – V. 68. – P. 333–338.
8. Chebanov, M. S. Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture / M. S. Chebanov, E. V. Galich // Technical Paper no 558. – 2010. – XXXII. – 303 pp.
9. Comparing Ultrasonography and Endoscopy for Early Gender Identification of Juvenile Siberian Sturgeon / J. L. Munhofen [et al.] // North American J. of Aquaculture. – 2014. – V. 76. – P. 14–23.
10. Desse-Berset, N. Emerging questions from the discovery of the long term presence of *Acipenser oxyrinchus* in France / N. Desse-Berset, P. Williot // J. Appl. Ichthyol. – 2011. – V. 27. – P. 263–268.
11. Distinguishing ovarian maturity of farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by Fourier transform infrared spectroscopy: a potential tool for caviar production management / X. Lu [et al.] // J Agric Food Chem. – 2010. – V. 58(7). – P. 4056–4064.
12. Gender and gonadal maturity stage identification of captive Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, using ultrasound imagery and sex steroids / H. Du [et al.] // Gen Comp Endocrinol. – 2016. - DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.08.004.
13. Guide for the identification of archaeological sea sturgeon (*Acipenser sturio* and *A. oxyrinchus*) remains / E. Thieren, W. Wouters, W. Van Neer // Cybium. – 2015. – V. 39(3). – P. 175–192.
14. Identification of the Molecular Sex-Differentiation Period in the Siberian Sturgeon / D. Vizziano-Cantonnet [et al.] // Molecular Reproduction and Development. – 2016. – V. 83(1). – P. 19–36.
15. Morphological Distinction Between Juvenile Stages of the European Sturgeon *Acipenser sturio* and the Atlantic Sturgeon *Acipenser oxyrinchus* / S. Wuertz [et al.] // Biology and Conservation of the European Sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758. – 2011. – P. 53–64.
16. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators / M. A. H. Webb [et al.] // Transactions of the American fisheries society. – 2002. – V. 131. – P. 132–142.
17. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. – URL <https://www.R-project.org/>.
18. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy / B. Falahatkar [et al.] // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2013. – V. 14(2). – P. 133–139.
19. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture / A. Hurvitz [et al.] // Aquaculture. – 2007. – V. 270. – P. 158–166.
20. Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) / M. A. Matsche, R. S. Bakal, K. M. Rosemary // J. Appl. Ichthyol. – 2011. – V. 27. – P. 627–636.