

УДК 594.124:639.4(262.5)

А. В. ПИРКОВА - к.б.н.

Институт биологии южных морей (ИнБЮМ) НАНУ, г. Севастополь, Украина

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ УЛУЧШЕНИЕ ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ *CRASSOSTREA GIGAS* TH. (BIVALVIA) КАК АСПЕКТ БИОТЕХНОЛОГИИ ЕЁ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ЧЁРНОМ МОРЕ

Описан способ получения гетерозисных личинок гигантской устрицы при скрещивании инбредной черноморской и аутбредной атлантической когорт производителей. Представлено сравнение морфо-метрических характеристик производителей и потомков от разных типов скрещивания. Показано превосходство гибридных личинок в темпе роста и выживаемости. Обсуждается феномен гибридной силы гетерозисных потомков.

**Ключевые слова:** гигантская устрица *Crassostrea gigas*, скрещивания, личинки, гетерозис, Чёрное море.

Генетическое улучшение и оптимизация условий культивирования – два аспекта единого процесса биотехнологии разведения *Crassostrea gigas*. Повышение выживаемости и устойчивости к болезням, увеличение темпа роста, увеличение соотношения веса мягких тканей к весу раковины, высокая степень усвоения пищи – все эти количественные признаки поддаются улучшению [16]. Генетического улучшения можно достичь различными способами: селекцией, получением гетерозисных гибридов и полиплоидизацией. Селекция по определённому признаку может быть успешной, если известна наследуемость этого признака. Так, коэффициент наследуемости размера у гигантской устрицы составляет 0,2 – 0,4 [10], т.е. реализация роста у потомков на 60 – 80 % зависит от условий их выращивания. Гетерозис и полиплоидизация – наиболее быстрые пути индуцирования генетических изменений. При гетерозисе у гибридов первого поколения усилен рост, продуктивность и выживаемость по сравнению с потомками каждой родительской линии [1]. Высоким темпом роста и (или) выживаемостью отличались гетерозисные гибриды *C. gigas*, полученные при скрещивании инбредных устриц методом подбора родительских пар [7; 11]. Эффект гетерозиса обнаружен у 20 % скрещиваний [7]. Инбредные линии были выведены в результате самооплодотворения кри-

осохранённой спермой после инверсии пола, а также при скрещивании сибсов [9].

При искусственном разведении устриц в питомниках маточное стадо – это небольшое количество экземпляров, по сравнению с числом особей вида. В таком случае некоторые генетические варианты или вовсе отсутствуют, или присутствуют с нетипичной для вида частотой [16]. Пополнение маточного стада особями, отобранными из природных популяций, как это практикуется в питомнике SATMAR (Франция) [12], частично восполняет генетическое разнообразие и позволяет избегать близкородственных скрещиваний, поскольку инбридинг, как известно, может быть направлен против продуктивности [1]. Однако сознательное применение инбридинга при выведении чистых линий является общим приёмом селекции для улучшения пород [16].

**Цель настоящей работы** – изучение темпа роста и выживаемости личинок гигантской устрицы *C. gigas*, полученных при групповом скрещивании атлантической аутбредной когорты производителей с черноморской инбредной линией.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в устричном питомнике ИнБЮМ НАН Украины (г. Севастополь) в 1999 - 2006 гг. В 1998 г. из Карадагского отделения ИнБЮМ были переданы 25 экз. трех-

летних *C. gigas* в качестве производителей [3]. В 1999 г. в устричном питомнике в результате группового скрещивания ( $10\text{♀} \times 1\text{♂}$ ) получено потомство гигантской устрицы. Ежегодно, начиная с 2000 по 2003 гг., личинок получали от скрещиваний потомков одних родителей (сибсов) и (или) при возвратных скрещиваниях (родителей с потомками). В качестве маточного стада использовали до 50 экз. устриц, а для скрещивания отбирали около 30 экз. устриц возраста от 1 до 4 лет.

В марте 2004 г. из питомника SATMAR (Франция) был получен спат *C. gigas* высотой раковины около 15 мм. До половозрелости его дорастивали в выростном садке на мидийно-устричной ферме в бухте Карантинная (г. Севастополь).

В 2006 г. были проведены три типа скрещиваний: № 1 - между устрицами черноморской когорты (инбридинг); № 2 - между устрицами атлантической когорты (аутбридинг) и № 3 - перекрестное скрещивание, проведенное по схеме:

$\text{♀} \times \text{♂}$  черноморская когорта  $\times$   $\text{♂} \times \text{♀}$  атлантическая когорта;

$\text{♀} \times \text{♀}$  атлантическая когорта  $\times$   $\text{♂} \times \text{♂}$  черноморская когорта.

Метод кондиционирования и стимуляции нереста производителей описаны ранее [4]. Нерест каждого производителя проходил в отдельном сосуде с профильтрованной морской водой и аэрацией. Для скрещивания отбирали одинаковое количество яйцеклеток от каждой самки и сперматозоидов – от самцов. Например, при необходимости получения 1 млн яйцеклеток от 20 самок, от каждой самки отбирали по 50 тыс. Количество яйцеклеток подсчитывали в камере Богорова, используя микроскоп МБС-9; количество сперматозоидов – в камере Горяева (после их обездвиживания в парах формальдегида) под микроскопом МБИ-6. Зрелость яйцеклеток оценивали при помощи микроскопа [5]. Оплодотворение проводили в 10 л сосуде при плотности размещения яйцеклеток 100 тыс./л. Через 15 мин. после оплодотворения яйцеклетки собирали на мельничном сите с диаметром ячеи 32 мкм, промывали морской водой и переносили в 125 л бак с

профильтрованной морской водой и аэрацией. Весь процесс выращивания личинок осуществляли согласно методике [4]. Личинок от скрещиваний № 1 и № 2 в течение двух суток от момента оплодотворения выращивали при плотности посадки 50 тыс. лич./л; на стадии велигера – при 10 тыс. лич./л; на стадиях великонхи и педивелигера – 5 тыс. лич./л. В скрещивании № 3 плотность посадки личинок на стадии велигера составила 30 тыс. лич./л, а на стадиях великонхи и педивелигера – 15 тыс. лич./л.

Количество личинок определяли как среднее значение в 1 мл, отбирая три раза штемпель - пипеткой, предварительно сконцентрировав их в 10 л морской воды. Выживаемость личинок – как разницу между предыдущими и настоящими значениями, выраженную в процентах от начального количества.

Коэффициент вариации размеров личинок определяли согласно формуле [2]:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \%. \quad (1)$$

Гетерозисную силу гибридов вычисляли по формуле:

$$h = \frac{Q}{W}, \quad (2)$$

где  $Q$  – двойное отклонение исследуемого признака от среднего родительского значения;  $W$  – разница между величинами признака родительских линий [8].

Индекс формы раковины производителей рассчитывали по формуле:

$$IF = \frac{(H + C)}{L}, \quad (3)$$

где  $H$  – высота, мм;  $C$  – толщина, мм;  $L$  – длина, мм раковины устриц [14]. Линейные характеристики устриц измеряли штангенциркулем (до 0,1 мм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение метрических характеристик производителей, отобранных для скрещивания в 2006 г., показало, что у черноморской когорты устриц более плоская раковина, чем атлантической (см. рис. 1). Об этом можно

судить как по индексу формы (IF), который равен 2,15 и 2,50 соответственно у черноморских и атлантических, так и по показателю отношения высоты к толщине раковины (табл.). Так, у 73 % черноморских производителей высота раковины больше толщины в 3,0 - 4,2 раза. Примерно такая же доля атлантических устриц, у которых высота раковины больше толщины в 1,41 – 3,0 раза.



Рис. 1. Часть производителей гигантской устрицы *Crassostrea gigas*: черноморская когорта (первый ряд) и атлантическая когорта (второй ряд)

Таблица. Распределение производителей гигантской устрицы *Crassostrea gigas* по показателю отношения высоты к ширине раковины (Н/С)

Н/С	Встречаемость, %	
	черноморская когорта	атлантическая когорта
1,41 - 3,00	13,3	70,0
3,01 - 4,20	73,4	26,7
4,21 - 5,40	13,3	3,3

Черноморская когорта инбредных устриц была получена в результате многолетнего искусственного отбора и близкородственных скрещиваний. Коэффициент инбридинга, определенный согласно графику [1], составил более 0,5. Отход инбредных устриц, в основном, происходил на личиночных стадиях, поэтому слабо приспособленные особи не вовлекались в последующие скрещивания. Атлантическая когорта устриц получена в питомнике SATMAR при скрещивании маточного стада с устрицами, ежегодно отбираемыми из природных популяций по критерию формы и внешнего вида раковин. Для исключения близкородственных скрещиваний, маточное стадо ежегодно пополнялось устрицами из природных поселений [12].

Личинки, полученные при скрещивании черноморской когорты инбредных устриц с атлантической, по темпу роста и особенно выживаемости значительно превосходили потомков от скрещивания устриц атлантической или черноморской когорты. Продолжительность выращивания личинок, от момента оплодотворения до оседания на субстрат, в скрещиваниях черноморских (№ 1) и атлантических устриц (№ 2) составила 25 суток, а в перекрестном скрещивании (№ 3) - 21 сутки (рис. 2).

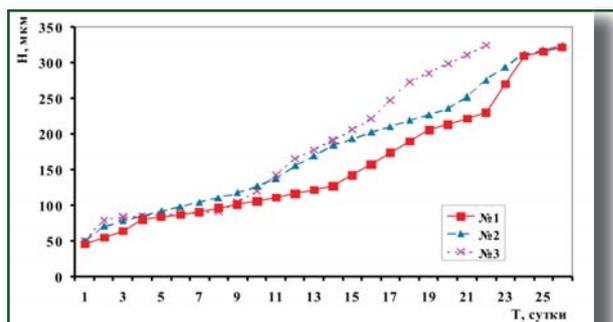


Рис. 2. Рост личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas*, полученных при инбредном (№ 1), аутбредном (№ 2) скрещиваниях и гетерозисе (№ 3)

Среднесуточный прирост гибридных личинок за период выращивания в 1,2 раза превысил прирост личинок от двух других скрещиваний и составил 13 мкм/сут. На стадии велигера (возраст 2 – 10 сут.) темп роста личинок во всех скрещиваниях был аналогичным. На стадиях поздней великонхи и педивелигера гибридные личинки превосходили в росте на 4,7 мкм/сут. не только инбредных, но и личинок от скрещивания № 2. В этот же период во всех скрещиваниях было отмечено максимальное варьирование размеров личинок. Так, коэффициент вариации размеров гибридных личинок составил 11,5 %; в скрещиваниях № 1 и № 2 - выше соответственно в 2,2 и 1,5 раза.

Показатель отношения высоты раковины к длине Н/Л у педивелигеров характеризует форму раковины. У личинок, готовых к оседанию, он изменялся в пределах от 1,0 до 1,4. При значениях близких к 1 личинки по форме напоминают круг; при значениях близких к 1,4 – эллипс. По этому показателю личинки в скрещивании № 3 занимали промежуточ-

ное положение (рис. 3). В скрещивании № 1 у 70 % личинок значения Н/Л находились в пределах 1,16 - 1,30; в скрещивании № 2 у 68 % - в пределах 1,06 - 1,15, а у 76 % гибридных потомков данный показатель изменялся от 1,11 до 1,30.

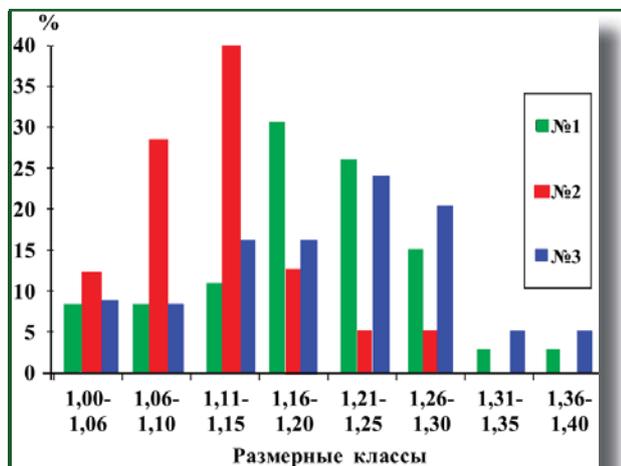


Рис. 3. Распределение педивелигеров гигантской устрицы *Crassostrea gigas* по значению показателя Н/Л: № 1 - в инбредном скрещивании, № 2 - в аутбредном скрещивании; № 3 - при гетерозисе

На протяжении всего периода выращивания выживаемость гибридных личинок была максимальной. Если в скрещиваниях № 1 и № 2 максимальный отход (30 и 16,6 % соответственно) отмечали в течение 7 сут. от момента оплодотворения, а на 14 сут. культивирования в инбредном скрещивании осталось 52,6 %; в аутбредном – 72,6 %, то в скрещивании № 3 насчитывалось 93,8 % личинок от исходного количества. Через три недели после скрещивания выживаемость личинок в опытах № 1 и № 2 составила соответственно 32,3 %, и 56,3 %, а в № 3 - 86,4 %. Гетерозисная сила ( $h$ ) гибридов по выживаемости, определенная для личинок на стадии педивелигера, составила 3,5. Если значения  $h > 1$ , то это указывает на гетерозис [8]. В этот период все гибридные личинки были готовы к оседанию (рис. 4). В двух других скрещиваниях до момента оседания личинок доращивали ещё 4 суток.

Несмотря на то, что выращивание гибридных личинок (скрещивание № 3) проходило при плотности посадки в три раза превышающей оптимальные значения, а выращивание личинок в опытах № 1 и № 2 – при оп-

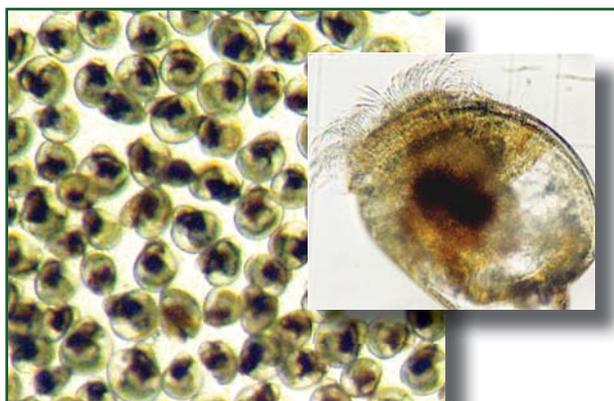


Рис. 4. Гетерозисные личинки гигантской устрицы *Crassostrea gigas*

тимальных условиях, гибридные личинки по темпу роста и выживаемости превосходили не только потомков черноморской, но и атлантической когорты. Такое значительное превосходство потомков в выживаемости и росте называется гетерозисом, а гетерозис возникает в гибридах, когда родители обладают генотипическими различиями [16].

Преобладание гибридов первого поколения над родительскими линиями объясняется наследованием доминантных аллелей, скрывающих вредные рецессивные мутации многофункциональных генов [11, 13]. С физиологической точки зрения у гибридов, независимо от рациона, более эффективны энергетический и белковый обмены и усвоение пищи [7, 10, 11].

Ранее методом подбора инбредных родительских пар были получены гетерозисные потомки *C. gigas* [7]. Инбредные линии были выведены в результате самооплодотворения после инверсии пола криосохраненной спермой. Известно, что инверсия пола у некоторых устриц происходит в период между двумя нерестами, т.е. изменение пола может быть зафиксировано через год. Сперму в замороженном виде хранили в течение года, а также поддерживали жизнеспособность производителей, от которых она получена. Сложность методов получения инбредных линий привела к засорению маточного стада на 60%, что подтверждено применением аллозимных маркерных генов. Гетерозисные потомки были получены только в 1 из 5 скрещиваний.

В устричном питомнике ИнБЮМ НАНУ получены гетерозисные потомки от групповых скрещиваний инбредной черноморской и аутбредной атлантической когорт без подбора родительских пар. Гибридную силу возможно объяснить ещё и тем, что у потомков, полученных в результате эколого-географического скрещивания, норма реакции на изменяющиеся условия среды расширяется до пределов исходных популяций [1], что было показано ранее на примере жемчужной устрицы [15]. Личинки, полученные при скрещивании производителей, отобранных из географически изолированных природных популяций, обладали лучшими физиологическими свойствами и физической структурой раковин, чем их родители, хотя их выращивание проходило на морской воде плохого качества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ получения гетерозисных личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* в питомнике отличается эффективностью и превосходит таковую от других скрещиваний в 6,7 - 8,2 раз. Эффективность в данном случае – это суммарное значение показателей превосходства по скорости роста (в 1,2 раза) и выживаемости (в 2,5 и 4 раза) при плотности посадки в три раза превышающей оптимальные значения, при которых выращивали личинок от других скрещиваний [6].

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубинин Н. П. Генетика [Текст] / Н. П. Дубинин. - Кишинев: Штиинца, 1985. – 526 с.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. [Текст] / Г. Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1973. – 338 с.
3. Орленко А. Н. Методы стимуляции созревания и нереста гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg) в искусственных условиях [Текст] / А. Н. Орленко // Рыбное хозяйство Украины. – 2006. - № 1. – С. 12 - 13.
4. Пиркова Г. В., Ладигина Л. В. Пат. №76680 С2, UA, МПК А01 К 61/00. Способ вироцирования гигантской устрицы *Crassostrea gigas* у Черномом море / Пиркова А. В., Ладигина Л. В.(UA); заявитель Институт биологии южных морей им. А. О.Ковалевского НАН Украины (UA). - № а 200507328; Заявл. 22.07.05; Опубл. 15.08.2006, Бюл. № 8.
5. Пиркова А. В. Гаметогенез и мейоз у гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th) [Текст] / А. В. Пиркова // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища. – 2006, вип. 2. – С. 227 - 231.
6. Пиркова Г. В. Пат. 86548 С2, UA, МПК А01 К 61/00. Способ одержання гетерозисних личинок устриці *Crassostrea gigas* при культивуванні в розпліднику / (UA); заявитель Инсти-

тут биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины (UA). - № а 200805366; Заявл. 24.04.2008; Опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.

7. Bayne B. L. Feeding behavior and metabolic efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) [Текст] / B. L. Bayne, D. Hedgecock, D. McGoldrick, R. Rees // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1999. – Vol. 233, No 1. – P. 115 - 130.
8. Hedgecock D. Hybrid vigor in Pacific oysters: An experimental approach using crosses among inbred lines [Текст] / D. Hedgecock // Journal of Shellfish Research. – 1994. – Vol. 13, No. 1. – P. 278 - 279.
9. Hedgecock D. Hybrid vigor is pervasive in crosses among inbred lines of Pacific oysters [Текст] / D. Hedgecock // Journal of Shellfish Research. – 1996. – Vol. 15, No 2. – P. 511.
10. Hedgecock D. Genetic improvement of farmed Pacific oysters on the U.S. west coast by selection and crossbreeding [Текст] / D. Hedgecock // Aquaculture'98 Book of Abstracts. – 1998. – P. 236.
11. Hedgecock D. Improving Pacific oyster brood stock through crossbreeding [Текст] / D.Hedgecock, J.P. Davis // Journal of Shellfish Research. – 2000. – Vol. 19, No. 1. – P. 614 - 615.
12. Kuczer J.-C. Rapport de Stage. C.F.P.P.A. de Coutances session BPAM. – 1993 - 1994. – 79 p.
13. Launey S. High Genetic Load in Pacific Oyster *Crassostrea gigas* [Текст] / S. Launey, D. Hedgecock // Genetics. – 2001. – Vol. 159, No 1. – P. 255 - 265.
14. Oheix J. Essai d'affinage en mer d'huitres creuses *Crassostrea gigas* issus de l'étang de thau [Текст] / J. Oheix, D. Coatanea // Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. RIDRV – 93 024 RA/ Palavas. – 1993. – 36 p.
15. Sakaguchi Rinzo. Culturing Pearl Oyster. // Publication number: JP2000354434; Application number: JP19990167046 19990614; Classification: - international: A01K61/00; A01K61/00; (IPC1-7): A01K61/00.
16. Wilkins N. P. The rationale and relevance of genetics in aquaculture an overview [Текст] / N. P. Wilkins // Aquaculture. – 1981. – No. 22. – P. 209 - 228.

СТАТТЯ ПОСТУПИЛА В РЕДАКЦІЮ 23.05.2013 г.

**Г. В. ПІРКОВА**

## ГЕНЕТИЧНЕ ПОКРАЩЕННЯ ГІГАНТСЬКОЇ УСТРИЦІ *CRASSOSTREA GIGAS* TH. (BIVALVIA) ЯК АСПЕКТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ПІ КУЛЬТИВУВАННЯ У ЧОРНОМУ МОРІ

Описаний спосіб одержання гетерозисних личинок гігантської устриці при схрещуванні інбредної черноморської і аутбредної атлантичної когорт плідників. Представлено порівняння морфо-метричних характеристик плідників і потомків від різних типів схрещування. Показано перевагу гібридних личинок по темпу росту і виживанню. Обсуджується феномен гібридної сили гетерозисних потомків.

**Ключові слова:** гігантська устриця *Crassostrea gigas*, схрещування, личинки, гетерозис, Чорне море.

**A. V. PIRKOVA**

## GENETIC IMPROVEMENT OF GIGANTIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS* TH. (BIVALVIA) AS AN ASPECT OF ITS CULTIVATION BIOTECHNOLOGY IN THE BLACK SEA

The article describes a way of obtaining heterotic larvae of gigantic oyster by means of breeding of an inbred Black Sea cohort and an Atlantic outbred one. Morphometric features of the breeding stock and the offspring's that were obtained as a result of different types breeding are compared. It was shown that hybrid larvae significantly prevail in growth and survival rate. Hybrid prevalence of heterotic offspring's is discussed.

**Keywords:** gigantic oyster *Crassostrea gigas*, breeding, larvae, heterosis, the Black Sea.