



УДК 59 + 639.2/.6

**О.В. КЕБЕРЛАЙН**, соискатель,  
**М.А. ОБОГРЕЛОВА**, аспирант,  
**А.В. САХАРОВ**, кандидат биологических наук, заведующий кафедрой,  
**А.А. МАКЕЕВ**, кандидат биологических наук, доцент кафедры,  
**И.В. МОРУЗИ\***, доктор биологических наук, заведующий кафедрой,  
**Е.В. ПИЩЕНКО\***, доктор биологических наук, доцент кафедры,  
**А.Е. ПРОСЕНКО**, кандидат химических наук, заведующий кафедрой,  
**С.Н. ЛУКАНИНА**, кандидат биологических наук, доцент кафедры

*Новосибирский государственный педагогический университет,  
\*Новосибирский государственный аграрный университет  
e-mail: Keberlayn@mail.ru*

### **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ОБЕСКЛЕИВАНИЯ ИКРЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЗАРОДЫШЕВОГО РАЗВИТИЯ ЗЕРКАЛЬНОГО КАРПА В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ РАЗВЕДЕНИЯ**

Приведены результаты исследований по сравнительному изучению различных способов обесклеивания икры зеркального карпа. При использовании антиоксиданта тиофана установлены коррекция окислительного стресса, нормализация процессов зародышевого развития этой рыбы.

**Ключевые слова:** зеркальный карп, обесклеивание икры, зародышевое развитие, окислительный стресс, антиоксидант.

В настоящее время вследствие существенного сокращения рыбных ресурсов значительно возрастает роль их искусственного воспроизводства. Фактические данные [1] позволяют утверждать, что использование существующих технологий искусственного разведения рыбы даже в условиях современных промышленных предприятий не обеспечивает полного восполнения рыбных запасов. Искусственное создание комфортных условий для развития рыбы в ранние периоды онтогенеза в заводских условиях позволяет значительно улучшить показатели выживаемости икры и личинок. Вместе с тем данные отечественных ученых [1], а также результаты наших наблюдений свидетельствуют о значительной гибели молоди в короткий промежуток времени после ее перевода в условия естественных водоемов. Чувствительность рыб к действию различных повреждающих агентов на ранних этапах зародышевого развития обусловлена их несовершенной системой адаптации к биотическим и абиотическим факторам. Одна из объективных причин данной проблемы – невозможность полного и точного воспроизведения на практике всех факторов, которые наблюдаются в природной среде обитания при оплодотворении, а затем на стадиях зародышевого и личиночного развития рыб [2, 3].

Несмотря на различные технологии искусственного разведения карпа, которые используются в разных странах, общие подходы основаны на получении половых продуктов от производителей, искусственном оплодотворении икры, ее обесклеивании и дальнейшей инкубации при заданных параметрах. Безусловно, каждая из технологических операций сопровождается нарушением естественных физиологических процессов и требует направленного воздействия на эти процессы со стороны человека. Отсутствие в доступных литературных источниках достаточно полной информации в отношении реализации механизмов адаптации зеркального карпа к «технологическим» нагрузкам на ранних этапах развития и эффективных технологий управления ими определяет актуальность настоящего исследования.

Цель данной работы – сравнить воздействие разных способов обесклеивания икры на интенсивность зародышевого развития зеркального карпа в условиях промышленной технологии разведения.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследования проводили на базе промышленного племенного рыбного хозяйства ООО «Маяк» Павловского района Алтайского края, которое специализируется на искусственном разведении популяции зеркального карпа. Материалами исследования стали оплодотворенная икра, зародыши и личинки зеркального карпа.

Технология искусственного разведения карпа, используемая на данном предприятии, включала получение половых продуктов от производителей, подобранных согласно селекционно-генетической карте, искусственное оплодотворение, обесклеивание икры и ее культивирование в аппаратах Вейса.

На всех этапах процесса соблюдали регламентируемые соответствующими инструкциями технологические требования: оценивали зрелость икры и соответствие параметров пробоподготовки половых продуктов для проведения искусственного оплодотворения.

Согласно протоколу эксперимента всю икру, полученную от одной самки и оплодотворенную одним самцом, помещали в три аппарата для обесклеивания в равном количестве – по 100 тыс. икринок в каждом. В первом аппарате обесклеивание икры производили традиционным для данного хозяйства способом – из расчета 1 л молока на 8 л воды. Зародыши и личинки в данном аппарате составили контрольную группу. Во втором аппарате в качестве обесклеивающего раствора вместо молока использовали 10%-й масляный раствор антиоксиданта тиофана из расчета 1 л данного раствора на 8 л воды (1-я опытная группа). В третьем аппарате для обесклеивания оплодотворенной икры применяли исключительно растительное масло в объеме 1 л на 8 л воды (2-я опытная группа). Все исследования проведены в 10 повторностях.

Контроль за развитием зародышей и личинок карпа осуществляли в проходящем свете с использованием комплекса оптико-структурного анализа «Olimpus-BH-2» производства Японии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Увеличение гибели личинок зеркального карпа после их перевода из заводских условий содержания в естественные водоемы позволило сформулировать научную гипотезу о недостаточно сформированных механизмах адаптации организма рыб, полученных с использованием технологий искусственного разведения. В связи с тем, что на ранних этапах онтогенеза система нейроэндокринной регуляции рыб не сформирована, контроль за развитием организма находится под влиянием генного и паракринного уровней регуляции. В условиях несформированной нейроэндокринной системы реализация процессов адаптации к меняющимся условиям существования может происходить за счет включения эволюционно наиболее раннего защитно-приспособительного механизма. Данный механизм характеризуется активизацией процессов свободнорадикального окисления органических веществ под действием различных биотических и абиотических факторов и адаптивным синтезом антиоксидантных соединений уже на стадии образования первых клеток.

Результаты исследования показали, что через 40 мин после оплодотворения в образцах икры, обесклеенной молоком (контрольная группа), отмечались лишь перемещение ооплазматического материала в направлении к анимальному полюсу желтка и начало формирования бластодиска (рис. 1, А). При использовании для обесклеивания икры раствора антиоксиданта тиофана (1-я опытная группа) через 40 мин после оплодотворения в области бластодиска регистрировали появление первой борозды дробления, которая делит его на два бластомера (рис. 1, Б).

Через 2,2 ч в образцах икры, обесклеенной молоком, зародыши зеркального карпа находились на стадии четырех бластомеров, а в обесклеенных антиоксидантом тиофаном – восьми (рис. 2, А, Б). При этом во всех исследуемых образцах икры 1-й опытной группы бластомеры были одина-

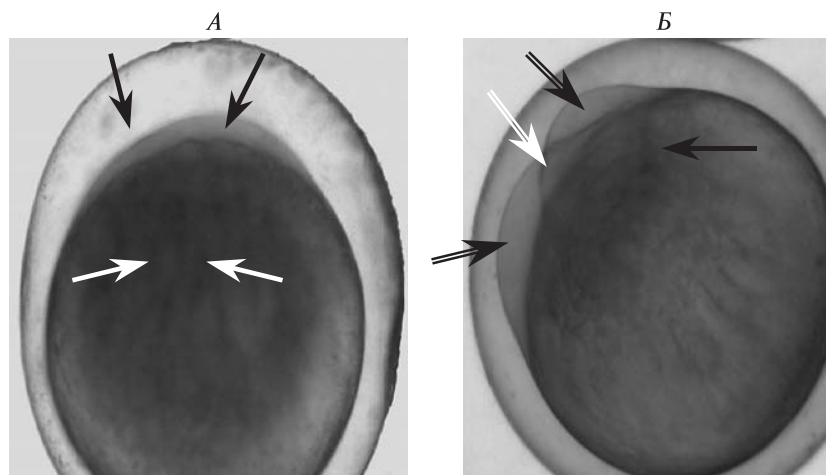


Рис. 1. Икра через 40 мин после оплодотворения:

А – контрольная группа; Б – 1-я опытная. Светлой стрелкой обозначены перемещения ооплазматического материала к анимальному полюсу желтка; темной – бластодиск; двойной светлой – первая борозда дробления; двойной темной – бластомеры. Нативный препарат. Ув. 40

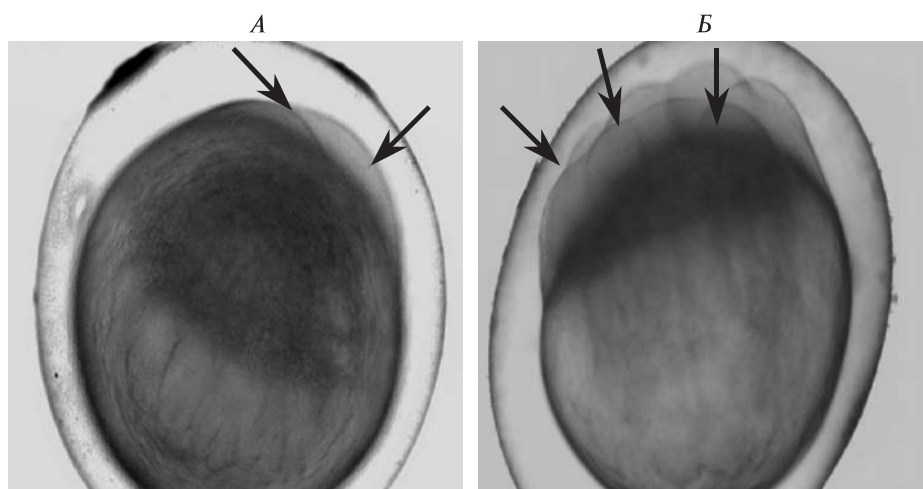


Рис. 2. Образцы икры через 2,2 ч после оплодотворения:  
 А – контрольная группа; Б – 1-я опытная. Стрелкой обозначены бластомеры.  
 Нативный препарат. Ув. 40.

кового размера и формы и не имели видимых морфологических признаков нарушения их строения.

Через 6 ч после оплодотворения интенсивность бластулогенеза в образцах икры, обесклеенных молоком и раствором антиоксиданта тиофана, имели ярко выраженные различия. В икре, находившейся в первом аппарате (контрольная группа), в структуре бластодиска четко идентифицировались крупные бластомеры. Характерным признаком для образцов икры данной группы было появление бластомеров разного размера. Содержание икры с неоднородными бластомерами составляло 15,7 % от общего количества икры (см. таблицу).

Рыбоводные качества икры, %

Показатель	Группа		
	Контрольная	Опытная	
		1-я	2-я
Оплодотворяемость икры	88,34 ± 8,05	92,13 ± 6,12	87,09 ± 7,34
Икра с неоднородными бластомерами	15,7 ± 1,65	3 ± 0,73***	16,08 ± 1,24
Выживаемость эмбрионов после оплодотворения, % от оплодотворенной икры			
через 6 ч	84,5 ± 3,05	97 ± 4,73*	83,7 ± 2,08
через 35 ч	74 ± 2,05	85,5 ± 3,73**	75,6 ± 1,98
Общий выход предличинок из икры	61,95 ± 4,85	74,1 ± 2,73*	62,35 ± 3,92

Статистически достоверное отличие относительно показателей контрольной группы:

\*  $p$  0,005.

\*\*  $p$  0, 01.

\*\*\*  $p$  0, 001.

В образцах икры, обработанной тиофаном (1-я опытная группа), через 6 ч от момента оплодотворения отмечали переход развития зародыша карпа в стадию крупноклеточной морулы. Образующиеся в результате дробления бластомеры мелкие, поэтому невозможно точно идентифицировать их количество.

В связи с тем, что тиофан является жирорастворимым и в используемой технологии обесклеивания оплодотворенной икры использовали масляный раствор данного антиоксиданта, проведены сравнительные исследования влияния масла при обесклеивании икры на процессы бластулогенеза. Существенных различий между икрой, обработанной молоком и маслом (контрольная и 2-я опытная группа), не обнаружено. Это дает основание считать, что высокая интенсивность зародышевого развития рыб, икра которых обработана масляным раствором тиофана, обусловлена влиянием данного антиоксиданта на интенсивность процесса бластулогенеза.

Таким образом, более интенсивное зародышевое развитие зеркального карпа от момента образования двух бластомеров и до формирования бластодермы на анимальном полюсе желтка при использовании новой технологии обесклеивания с применением антиоксиданта тиофана может свидетельствовать о существенном влиянии свободнорадикальных соединений на процесс бластулогенеза. Считается, что в процессе эмбрионального развития рыбы проходят ряд критических периодов, в течение которых наблюдается повышенная чувствительность к изменению внешних условий среды. У карповых критическим можно считать период от оплодотворения икры до образования крупноклеточной морулы. Особенно высока чувствительность икры в начале дробления. При этом стадия четырех–восьми бластомеров используется для определения рыбоводных качеств икры [4, 5]. На практике основным критерием качеств икры является типичность дробления. Появление избыточного числа бластомеров, а также бластомеров разного размера – признак ее низкого качества. С нашей точки зрения, рыбоводные качества икры в данный критический период определяются возможностью клеток на ранних этапах развития обеспечивать собственную свободнорадикальную защиту. Это обусловлено тем, что при искусственной технологии разведения карпа в икре возникает состояние гипоксии вследствие изменения кислородного режима при ее получении от самки нефизиологическим способом. Кроме того, механические повреждения икры в процессе оплодотворения *in vitro*, а также интенсивное использование трофических веществ в период бластулогенеза сопровождаются интенсивным окислением липидов с избыточным образованием высокотоксичных свободнорадикальных соединений. Можно полагать, что выявленное в результате исследования снижение количества бластомеров, а также их неравномерное дробление, а возможно и гибель отдельных бластомеров – отражение повреждающего эффекта свободнорадикальных соединений в условиях дефицита собственных антиоксидантов. Согласно мнению ряда авторов, повышенное содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов и депрессия ферментов антиоксидантной защиты характеризуется как окислительный стресс [6–8].

По данным литературных источников [9], на раннем этапе эмбрионального развития рыб их антиоксидантные системы представлены един-

ственным соединением – меланином, которого недостаточно для обеспечения антиоксидантной защиты. Полученные результаты позволяют считать, что применение тиофана блокирует свободнорадикальные соединения, обеспечивая равномерное дробление и более интенсивное развитие зародышей карпа по сравнению с исследуемыми образцами икры, полученной при традиционной для данного рыбоводного хозяйства технологии ее обесклеивания.

С нашей точки зрения, регистрируемое увеличение количества blastomerov в образцах икры 1-й опытной группы не является признаком аномального развития. Это подтверждается результатами анализа гибели эмбрионов рыб на стадии восьми blastomerov. Выживаемость зародышей в икре, обесклеенной молоком, на 12,5 % ниже соответствующего показателя икры, обесклеенной по разработанной технологии с использованием антиоксиданта тиофана (см. таблицу).

Выдвинутая гипотеза об интенсивном окислении органического субстрата желтка при окислительном стрессе подтверждается исследованием зародышей карпа на стадии гастрюляции и органогенеза. В икре всех исследуемых групп через 35 ч после оплодотворения происходило обособление хвостового отдела зародыша и рост в длину зачатка кишечной трубки (рис. 4, А, Б). Данные морфометрического анализа показали, что площадь желтка в икре контрольной группы на 9,37 % меньше, чем в 1-й опытной. Эти данные явились основанием предполагать, что высокореакционные токсические свободнорадикальные соединения могут оказывать влияние на ход морфогенетических процессов и интенсивность развития зародышей. Витальное исследование наиболее доступных для изучения анатомических структур зародышей карпа, таких как глаз, показал, что его площадь и площадь хрусталика у эмбрионов контрольной и 1-й опытной групп имели статистически достоверные различия. У зародышей контрольной группы эти показатели были на 34,89 и 39,59 % соответственно

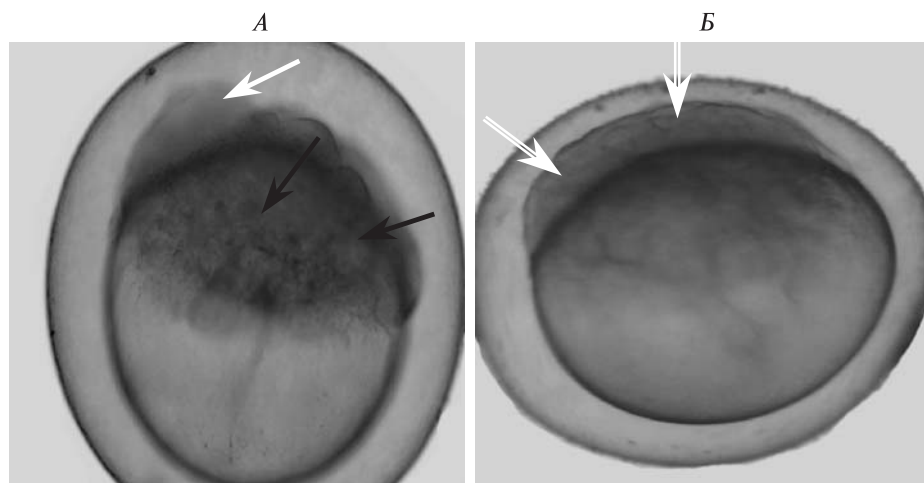


Рис. 3. Икра через 6 ч после оплодотворения (стадия крупноклеточной морулы): А – контрольная группа; Б – 1-я опытная. Светлой стрелкой обозначены неравномерные blastomerы; темной – равномерные; двойной светлой – морула. Нативный препарат. Ув. 40.

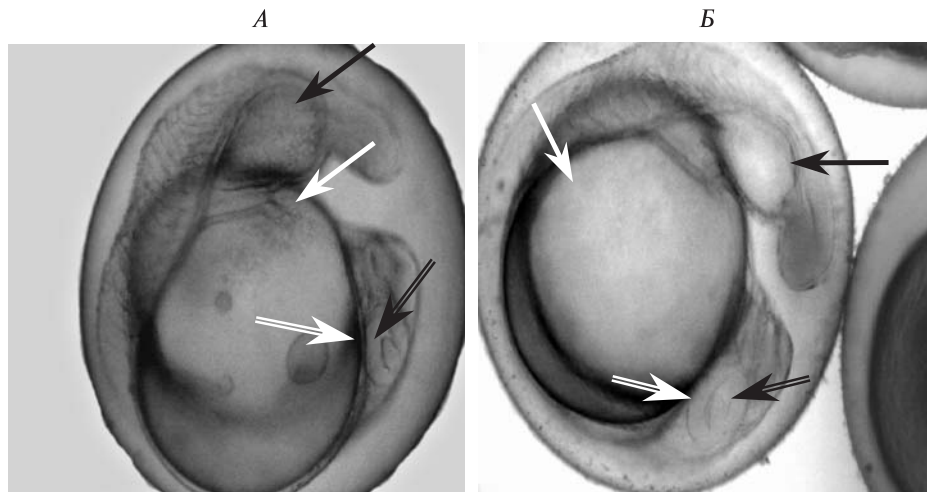


Рис. 4. Икра через 35 ч после оплодотворения (этап обособления хвостового отдела от желточного мешка):

А – зародыши контрольной группы; Б – 1-й опытной. Светлой стрелкой обозначен желток; темной – зачаток кишечной трубки; двойной светлой – глаз; двойной темной – хрусталик глаза. Нативный препарат. Ув. 40.

ниже, чем соответствующие значения зародышей 1-й опытной группы. Сравнительное изучение двигательной активности эмбрионов зеркального карпа на сроке 35 ч показало, что число движений зародышей в икре 1-й опытной группы составляло  $15 \pm 1,49$  раза в мин, а в икре контрольной –  $10 \pm 1,24$  и эти значения имели достоверные различия. Следует отметить, что на сроке 35 ч сохранялась выявленная на более ранних сроках развития закономерность в отношении выживаемости зародышей карпа 1-й опытной группы. Данный показатель на 11,5 % превышал соответствующий показатель зародышей 2-й опытной группы (см. таблицу).

Различия в интенсивности развития рыб, полученных при традиционной технологии обесклеивания икры и новой, с использованием антиоксиданта тиофана, отчетливо проявилась в период выхода личинок из икры. На данном этапе развития зеркального карпа проведен сравнительный анализ сроков выклева единичных особей и массовый выход личинок из икры. Кроме того, исследовали общий процент выхода личинок из икры.

Результаты исследования показали, что в 1-й опытной группе выход единичных личинок из икры наступал на 3 ч раньше, чем в контрольной, а массовый выклев – на 5 ч. При этом общий выход предличинок из икры в 1-й опытной группе на 12,15 % превышал соответствующий показатель контрольной (см. таблицу).

Таким образом, результаты исследования влияния различных технологий обесклеивания икры на интенсивность зародышевого развития зеркального карпа в условиях промышленной технологии разведения показали, что одним из факторов, оказывающих существенное влияние на его развитие в ранние периоды онтогенеза, является окислительный стресс. Несовершенная система адаптации рыб в зародышевой период определяет возможность свободнорадикального повреждения клеток уже на стадии первых бластомеров. Присутствие в составе икры избытка аутооксидабельных компонен-

тов в виде моно- и полиненасыщенных жирных кислот, необходимых для развития зародышей и личинок рыб, несет потенциальную угрозу протекания реакций перекисного окисления с формированием высокотоксичных свободнорадикальных соединений [5]. Можно полагать, что кроме повышенного расхода трофических веществ желтка в зародышевый период, свободнорадикальное повреждение клеток формирующихся органов, в том числе и желудочно-кишечного тракта, обуславливает гибель личинки.

#### ВЫВОДЫ

1. В условиях промышленной технологии разведения карпа окислительный стресс оказывает негативное влияние на морфогенетические процессы, снижает интенсивность развития зародышей и выход предличинок из икры.

2. Технология обесклеивания икры с использованием антиоксиданта тиофана увеличивает интенсивность роста и развития зародышей карпа на стадиях раннего и позднего бластулогенеза в сравнении с традиционными технологиями и увеличивает выживаемость предличинок после выклева из икры.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ефанов В.Н. Проблемы искусственного разведения рыб в аспекте концепции развития рыбного хозяйства Российской Федерации на период с 2020 года // Наука, образование, общество: сетевой журн. <http://journal.sakhgu.ru/archive/2005-02-0>.
2. Жукинский В.Н. Влияние абиотических факторов на разнокачественность и жизнеспособность рыб в раннем онтогенезе. – М.: Агропромиздат, 1986. – 124 с.
3. Журавлева Н.Г. Влияние абиотических и биотических факторов среды на выживаемость эмбрионов и молоди рыб // Вестн. МГТУ. – 2009. – Т. 12, № 2. – С. 338–343.
4. Лужин Б.Г. Зародышевое развитие карпа // Рыбоводство и рыболовство. – 1977. – № 2. – С. 11–12.
5. Макеева А.П. Эмбриология рыб. – М., 1992. – 216 с.
6. Дрошнев А.Е., Костромитинов Н.А., Завьялова Е.А. Состояние свободнорадикальных процессов и системы антиоксидантной защиты у рыб // Ветеринария. – 2006. – № 3. – С. 51–53.
7. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Цема Н.И. Окислительный стресс и проблемы эмбриональной смертности ихтиофауны: неучтенный фактор ущерба естественному воспроизводству природных популяций в условиях хронического загрязнения водных экосистем // Материалы международной научной конференции. – Ростов/нД, 2004. – С. 49–51.
8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. – М.: Слово, 2006. – 553 с.
9. Исуев А.Р. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов в раннем онтогенезе рыб: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1990. – 36 с.

*Поступила в редакцию 16.12.2009*

O.V. KEBERLAIN, M.A. OBOGRELOVA, A.V. SAKHAROV, A.A. MAKEYEV,  
I.V. MORUZI, E.V. PISHCHENKO, A.E. PROSENKO, S.N. LUKANINA

#### EFFECT OF VARIOUS TECHNIQUES EMPLOYED FOR THE REMOVAL OF EGG ADHESIVENESS ON THE INTENSITY OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF MIRROR CARP UNDER CONDITIONS OF COMMERCIAL FISH RAISING

The findings of investigations on the comparative study of various techniques employed for the removal of egg adhesiveness in mirror carp are submitted. The oxidative stress correction and the embryonic development normalization by using the thiophan antioxidant have been determined.

**Keywords:** mirror carp, removal of egg adhesiveness, embryonic development, oxidative stress, antioxidant.