

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

На правах рукописи

Баяндина Юлия Сергеевна

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА
ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА
SCOPHTHALMUS MAEOTICUS (PISCES, SCOPHTHALMIDAE)

Специальность 1.5.16 – гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Ханайченко Антонина Николаевна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Севастополь – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Влияние биотических и абиотических факторов на характеристики спермы камбалы калкана и методы определения ее качества.....	17
1.2. Влияние биотических и абиотических факторов на эмбриогенез и развитие личинок камбалообразных	42
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	66
2.1. Материал исследования.....	66
2.2. Методы определения характеристик спермы камбалы калкана	67
2.3. Методика проведения экспериментов по развитию эмбрионов и личинок калкана.....	70
2.4. Методы статистической обработки данных	73
2.5. Модификация стандартного метода компьютерного анализа спермы рыб с использованием плагина wrMTrck_Batch.....	74
РАЗДЕЛ 3. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ХАРАКТЕРИСТИК СПЕРМЫ КАМБАЛЫ КАЛКАНА	79
3.1. Влияние способа подготовки препарата спермы для микроскопирования на характеристики движения сперматозоидов.....	79
3.2. Влияние степени разбавления спермы на характеристики активности сперматозоидов.....	81
3.3. Динамика активности спермы калкана в зависимости от времени после активации.	84
3.4. Межгодовые показатели характеристик активности спермы калкана	89
3.5. Вариабельность характеристик спермы камбалы калкана в зависимости от фазы нерестового периода.....	93
3.6. Оценка связи между размерно-возрастными и биологическими характеристиками самцов и свойствами спермы калкана	96

РАЗДЕЛ 4. РАЗВИТИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК КАЛКАНА	100
4.1. Оценка качества эмбрионов и ранних личинок камбалы калкана.....	100
4.2. Влияние родительского «фактора» на качество и выживаемость икры и личинок калкана	107
4.3. Термочувствительность икры и личинок, полученных от разных производителей в разные фазы нерестового периода	114
4.4. Влияние гидрологического режима на выживаемость икры, выживаемость и рост личинок калкана.	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
ВЫВОДЫ	134
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	138

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень разработанности темы исследования. Проблема естественного и искусственного воспроизводства рыб является одной из фундаментальных комплексных биологических и океанологических задач.

Нарушения экологического равновесия привели к снижению естественного воспроизводства рыб. Активный рост промышленного рыболовства в течение всего XX и начале XXI века привел к тому, что у большинства ценных промысловых рыб ускорился темп полового созревания, снизились средние размеры, ускорился темп роста, в популяциях стали преобладать молодые особи [Куманцов, 2013, Ги-рагосов, 2015; Надолинский, 2018, Шляхов, 2019]. В настоящий момент искусственное воспроизводство рыб является безусловной необходимостью.

Главным условием устойчивого функционирования популяции рыб является возможность реализации репродуктивного потенциала, обусловленная структурой и численностью популяции, качеством гамет производителей, абиотическими условиями, определяющими возможности оплодотворения и выживаемости потомков до начала экзогенного питания и биотическими условиями, определяющими выживаемость новых генераций на более поздних этапах онтогенеза.

Ценный промысловый вид рыб и перспективный объект марикультуры, черноморская камбала калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) (*Scophthalmidae*, Pisces), является одним из важных компонентов экосистемы Черного моря, так как в течение жизненного цикла входит в состав разных биоценозов: в планктон – от начала эмбриогенеза до окончания раннего личиночного развития, в нектон – до окончания эмбриогенеза, далее, в мальковый период развивается в прибрежных биоценозах и переходит в донные биоценозы шельфа во взрослом состоянии.

Эффективность воспроизводства рыб зависит от климатических, в частности, гидрологических условий, выживаемости и нормы развития икры и личинок, которые определяются качеством гамет, которые в свою очередь связаны с биологическими характеристиками производителей.

Физиологическое состояние производителей оказывает непосредственное влияние на качество половых продуктов и приводит к изменениям нерестового поведения рыб [Владимиров, 1965; Сакун, Буцкая, 1968; Шульман, 1972; Brooks, 1997, Гиригосов, 2020]. Обычно фенотип потомства определяется и генами матери, и генами отца, однако вклад материнского и отцовского фактора в развитие эмбрионов рыб различен. Материнский фактор, т.е. вклад в потомство, определяющий качество икры, является продуктом как ядерно-генетического, так и вне-ядерного, негенетического материала [Chambers, 1996; Rideout, 2005; Kroll, 2013]. Для калкана известно, что низкая вариабельность размера икринок калкана, полученных от одной самки, повышает вероятность нормального развития эмбрионов [Битюкова, 1998]. Существует ограниченное количество исследований, показывающих, что отцовский фактор, а именно качество спермы, влияет на морфологию и выживаемость потомства в течение раннего онтогенеза рыб [Ottesen, 2007; Kroll, 2013; Siddique, 2017; Benini, 2018]. Вариабельность показателя оплодотворения положительно коррелирует со скоростью движения сперматозоидов и продолжительностью активности спермы после активации [Гинзбург, 1968; Suquet, 1995; Holt, Van Look, 2004; Cosson, 2008, 2019]. При применении разных методов активации и оценки спермы атлантического тюрбо (родственного черноморскому калкану) разными авторами были получены различные данные по продолжительности активности сперматозоидов: до 1 мин [Chauvaud, 1995]; до 10 мин [Suquet, 1995; Dreanno, 1999] до 40 мин [Gosz, 2011].

Характеристики спермы черноморского калкана и влияние биологических характеристик самцов на ее качество ранее изучены не были; влияние «родительского» (материнского и отцовского) фактора на характеристики и выживаемость на ранних стадиях онтогенеза практически не изучены.

Отклонения от оптимальных гидрологических условий инкубации рыб могут оказывать повреждающее действие на эмбрионы и повышать их смертность. Влияние солёности и температуры на развитие черноморского калкана на ранних этапах онтогенеза в море и в экспериментальных условиях изучали ранее В. П. Попова [1975]; А. Д. Гордина [1987, 1999]; Ю. Е. Битюкова [1982, 1989, 1998]. Было определено, что в процессе эмбриогенеза меняется термочувствительность эмбрионов калкана [Битюкова, 1982] и тюрбо [Gibson, 1995]. Толерантность к пониженным температурам в начале эмбриогенеза у калкана оказалась выше, чем на этапах от завершения гастрюляции до вылупления. Нижняя граница оптимальной температуры воды для успешного эмбриогенеза калкана находится в пределах 8–12 °С, а верхняя граница температуры для всех этапов составляет 18 °С [Битюкова, 1982]. Однако, различия температурного оптимума развития и выживаемости эмбрионов калкана, полученных в результате скрещиваний от разных производителей из нерестовых стад в разные фазы нерестового сезона (от апреля до июня), не установлены.

При выращивании рыб в искусственных условиях на выживаемость икры и личинок оказывает влияние гидродинамика в инкубаторах (поток воздуха и направление циркуляции воды). Оптимальные уровни продувки воздухом, формирующие разный уровень турбулентности воды в экспериментальных аквариумах, различны для разных видов рыб [Killgore, 1987; Gaignon, 1998; Li, 2018]. В ряде экспериментов показано, что сильный уровень турбулентности (в результате продувки воздухом в искусственных условиях) приводит к гибели нежизнеспособных эмбрионов черноморского калкана на этапе вылупления [Маслова, 2013]. Данные о размерных характеристиках и выживаемости эмбрионов и личинок при различных уровнях перемешивания для черноморского калкана отсутствуют.

Цель работы – оценить влияние некоторых биотических и абиотических факторов на эффективность реализации нерестового потенциала черноморского калкана.

Для реализации цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

- Оценить влияние родительского фактора (материнского и отцовского вклада, определяющего качество гамет и успешное развитие потомства) на выживаемость икры и характеристики личинок на выклеве и переходе на внешнее питание;

- Установить наличие связей между биологическими характеристиками самцов и характеристиками подвижности их спермы;

- Определить вариабельность характеристик спермы калкана из естественных популяций в различные годы и разные фазы нерестового периода, динамику изменения подвижности спермы в зависимости от времени после активации;

- Разработать методику применения компьютерных технологий к исследованиям характеристик спермы калкана и апробировать её для исследования активности спермы калкана

- Определить влияние температуры на выживаемость и характеристики икры и ранних личинок, полученных в разные фазы нерестового периода;

- Изучить влияние гидрологического режима на выживаемость икры, выживаемость и развитие личинок калкана.

Научная новизна полученных результатов. Разработан собственный экспериментальный протокол, модифицирована стандартная методика эксперимента [Павлов, 2006, Cosson, 2008, 2019] и анализа количественных и качественных (средние скорости движения, процент подвижных сперматозоидов и их концентрация в эякуляте) характеристик спермы с применением современных компьютерных технологий.

Впервые с использованием собственного экспериментального протокола, проведен мониторинг характеристик половых продуктов самцов черноморского калкана из естественных популяций юго-западного шельфа Крыма в течение нескольких нерестовых сезонов.

Установлен диапазон индивидуальных характеристик спермы черноморского калкана по таким показателям как: концентрация, скорость и доля подвижных сперматозоидов, продолжительность их активности.

Получены данные по длительности активности спермы отдельных самцов калкана (от 1 часа до 7 часов) после ее активации – максимальные среди камбалобразных рыб.

Впервые были определены различия термопреферендума эмбрионов калкана, полученных от разных производителей в разные фазы нерестового сезона.

Впервые для калкана определено влияние не только материнского, но и отцовского фактора на размерные характеристики личинок и их вариабельность, выживаемость на выклеве и при переходе на внешнее питание.

Выявлено, что на этапах эмбрионального развития наличие слабого барботажа является фактором, негативно влияющим на выживаемость эмбрионов, но выживаемость личинок от выклева до перехода на внешнее питание повышается.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящая работа является одной из составных частей комплексных исследований репродуктивного потенциала черноморского калкана из естественных популяций шельфа Крыма. Результаты исследования существенно дополняют данные о влиянии качества исходных родительских гамет на эффективность воспроизводства калкана в зависимости от комплекса абиотических факторов (температурных и гидрологических условий).

Данные могут быть использованы для:

- оценки состояния нерестового потенциала естественной популяции калкана;
- прогнозирования успешного скрещивания производителей калкана и жизнеспособности потомства в марикультурных хозяйствах;
- селекции производителей: экспресс-оценка качества половых продуктов.
- оценки характеристик спермы рыб и подвижности других объектов с помощью авторского плагина wrMTrck_Batch.

Методология и методы исследования. Использован прижизненный метод отбора половых продуктов у самок и самцов калкана, метод оплодотворения икры калкана, метод инкубирования эмбрионов и личинок калкана в искусственных условиях. Освоена методика измерения морфологических структур икры и личи-

нок калкана. Освоен стандартный метод и разработана собственная модификация метода подготовки препарата спермы для видеорегистрации.

Модифицирована методика анализа характеристик подвижности спермы с применением современных компьютерных технологий.

Использованы методы компьютерного статистического анализа данных: корреляционный анализ, дисперсионный анализ ANOVA, метод главных компонент.

Положения, выносимые на защиту:

- Межгодовые среднестатистические показатели качества спермы (скорости и доли подвижных сперматозоидов) значимо варьируют, под влиянием разных экологических (абиотических и биотических) условий, в которых находятся нерестовые популяции черноморского калкана

- Длительность активности спермы самцов калкана после её активации превышает значения, зарегистрированные для других камбалообразных рыб.

- Коэффициент вариабельности размеров икринок калкана от одного скрещивания является одним из важных параметров качества икры.

- Разнокачественность раннего онтогенеза калкана определяется комплексом абиотических и биотических факторов, в том числе «материнским» и «отцовским» фактором.

- Термопреферендум эмбрионального развития калкана изменяется в течение нерестового сезона.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.16 – гидробиология, пункту 1: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях, с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)», а также пункту 7 паспорта «... Разработка методов экологического мониторинга водных экосистем».

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена применением адекватного набора методов исследований, оригинальными схемами постановки экспериментов, достаточными объемами экспериментальных выборок (индивидуальные характеристики спермы были изучены по пробам от 142-х самцов калкана, проведен мониторинг развития 18 партий оплодотворенной икры и личинок калкана, прослежено развитие 35 тыс. эмбрионов), использованием необходимых методов и компьютерных программ статистической обработки массивов данных.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на отечественных и международных конференциях: V Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2007» (24–27 сентября 2007 г), II Международная ихтиологической научно-практической конференция (Севастополь, 16–19 сентября 2009 г.), VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2011» (24 – 27 мая 2011 г), VIII международная научно-практическая конференция по проблемам водных экосистем. PontusEuxinus 2013 1 – 4 октября 2013 г, X Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2017» по проблемам водных экосистем, в рамках проведения Года экологии в Российской Федерации, 17–20 ноября 2017 г., Севастополь, на Всероссийской научно-практической. конференции, г. Краснодар, 17–19 мая 2018. Кубанский государственный университет, 2018г., XI Всероссийской онлайн-школы-семинара

для молодых ученых, студентов и аспирантов, г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2001. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ. Международной научной конференции, посвященной 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий» 13–18 сентября 2002 г., г. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ.

Личный вклад автора. Автором осуществлен анализ имеющейся информации по проблематике представленной диссертации и подготовлен обзор литературы. Им выполнены все виды экспериментальных работ, проведена статистическая обработка и графическое представление полученных результатов. Автором модифицирована и апробирована методика компьютерного анализа количественных и качественных характеристик спермы калкана. Автор принял непосредственное участие в анализе полученной информации, в подготовке рукописи диссертации и статей соответствующей тематики.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликованы 16 печатных работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 3 статьи в изданиях, индексируемых в WoS (Scopus), 3 статьи в сборнике научных трудов и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти разделов, заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 157 страницах, содержит 20 таблиц и 31 рисунок. Список литературы включает 155 источников, в том числе 98 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю, к. б. н., Антонине Николаевне Ханайченко, за помощь на протяжении всех этапов работы, а также ведущему сотруднику отдела аквакультуры и морской фармакологии к. б. н. Виталию Евгеньевичу Гирагосову за отбор и доставку проб спермы калкана, предоставленные данные по биоанализу самцов калкана и помощь в обсуждении материалов исследования. Особую благодарность выражаю д. б. н. Юрию Николаевичу Токареву и профессору, д. б. н. Сергею Борисовичу Гулину за моральную поддержку и помощь в сложных жизненных и рабочих моментах во время написания рукописи диссертации. За терпение и понимание

руководителю отдела Биофизической экологии к. б. н. Ольге Владимировне Машуковой и руководителю лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана, к.б.н. Ольге Валериевне Кривенко.

Особую благодарность выражаю членам моей семьи и друзьям за терпение, понимание и всестороннюю поддержку.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Камбала калкан *Scophthalmus maeoticus* (*Scophthalmidae*, *Pisces*) по принятой научной классификации относится к роду ромбы (*Scophthalmus*), отряд камбалообразные (*Pleuronectiformes*), семейство Ромбовые (син. Калкановые, Скофтальмовые) – *Scophthalmidae*, классу костные рыбы.

К роду «ромбы» на данный момент относят четыре вида камбал [Fish Identification, электронный ресурс]:

Scophthalmus aquosus (Mitchill, 1815) обитает в Атлантическом океане, вдоль западного побережья Северной Америки от залива Святого Лаврентия в Канаде до северной Флориды в США.

Scophthalmus rhombus (Linnaeus, 1758) – гладкий ромб, или блиль, распространен в Восточной Атлантике до Марокко, известны находки в Исландии. Встречается в Средиземном и Черном море.

Scophthalmus maximus (Linnaeus, 1758) – тюрбо, или большой ромб, распространены в восточной части Атлантического океана от Норвегии (ареал заходит за полярный круг); в Северном море, на большей части акватории Балтийского моря; вдоль западного побережья Европы, включая Британские острова, и на юг до Буждура (Западная Сахара); в Средиземном море.

Scophthalmus maeoticus (Pallas, 1814) — черноморская камбала калкан, эндемик Чёрного моря, встречается в Азовском море и прилегающей части Мраморного моря, заходит в устья Днепра, Днестра, Дона [Куцын, 2018]. Тело калкана сильно сжато с боков, глаза смещены на левую сторону. Верхняя сторона пигментирована, нижняя — обычно нет. На коже калкана расположены острые костяные шипы со вздутыми основаниями.

Черноморская камбала калкан (далее по тексту – калкан), (*Scophthalmus maeoticus*) (Pallas, 1814) – хищная донная рыба, обитающая вдоль всего Черноморского побережья на песчаных и песчано-илистых грунтах с вкраплением ракушечника [Зернов, 1918]. Образует обособленные стада, ведущие оседлый образ

жизни и совершающие небольшие миграции в пределах своего основного ареала в шельфовой зоне на глубинах до 120 м [Марти, 1939; Карапеткова, 1964; Ivanov, 1985].

Взрослые особи могут достигать максимальной длины 85 см и массы 15 кг (Рисунок 1). Самки калкана достигают половой зрелости на 6–8 году жизни [Попова, 1967], единичные особи раньше – в 3 [Овен, 2004] или 4 года [Попова, 1954; Гиригосов, 2008, 2020]. Стандартная длина тела (SL), при которой 50 % самок достигает половой зрелости, соответствует 39,8 см [Пятинский, 2017]. Весной калкан подходит ближе к берегу на нерест. Нерест проходит вдоль всех берегов Чёрного моря, преимущественно с конца марта до второй половины июня, наиболее интенсивно – в мае [Попова, 1954]. Сроки нереста могут варьировать в зависимости от гидрологических условий конкретного года. На юго-западном шельфе Крымского полуострова нерестовый сезон калкана в 2007–2018 гг. длился в среднем 2 месяца – со второй декады апреля до конца первой декады июня, а наиболее интенсивная фаза нереста приходилась на первые две декады мая. В нересте участвовали самки общей длиной от 44 до 79 см (весом от 1,6 до 10,8 кг) [Гиригосов, 2020].

По окончании нереста летом калкан отходит на глубины и до осени ведет малоактивный образ жизни. При осеннем понижении температуры воды калкан (также на непродолжительный период) вновь подходит ближе к берегу и при этом активно питается. Зимует на глубинах 15–120 м [Ivanov, 1985; Надолинский, 1998; Болтачев, 2017].

Численность и структура популяции калкана непостоянны из-за интенсивного промысла этого вида, слабой эффективности его размножения, низкой выживаемости ранних стадий развития и сложного метаморфоза.

Калкан является одним из важных компонентов экосистемы Черного моря, так как в процессе жизненного цикла обитает практически во всех морских биотопах: в нейстоне развивается его икра, раннее развитие билатеральных личинок проходит в планктоне, метаморфозированные мальки обитают в прибрежных водах, а наступление половой зрелости в 3–4 для самцов и 4–5 лет для самок проис-

ходит в придонных глубинных водах [Ivanov, 1985; Надолинский, 1998; Болтачев, 2017].



Рисунок 1 – Взрослая особь черноморского калкана из улова 2007 г. на фото сотрудники отдела аквакультуры ИнБЮМ слева направо Денис Ельников, Виталий Гирагосов, Юлия Баяндина

Калкан – один из наиболее ценных объектов промысла Чёрного моря. Состояние запаса калкана в Чёрном море [Turan, 2019] в водах Российской Федерации оценивается как депрессивное [Куманцов, 2013, Гирагосов, 2015].

Известно, что у берегов Крыма исторически промысел калкана осуществлялся донными сетями, однако с 50-х годов XX века в СССР был разрешен его траловый лов. В течение 1951–1953 гг. произошел существенный перелов калкана, что вызвало сокращение его запасов, и в 1954 г. траловый лов был закрыт. Начиная с 1970-х гг., в нейтральных водах Черного моря траловый и сетный промысел существенно увеличила Турция (годовые уловы достигали 4 тыс. т). С середины 80-х Турция прекратила лов калкана в международных водах, однако к

этому времени запасы западной и восточной популяций калкана оказались подорванными. С 1986 г. всеми странами черноморского бассейна, кроме Турции, был введен полный запрет на промысел калкана. За период с 1990 до 2000 гг. годов биомасса запасов калкана незначительно увеличилась [Надолинский, 2018]. В период 2000–2013 гг. вылов черноморского калкана около берегов Крыма находился в диапазоне 75–295 т. В связи с переходным периодом (вхождение Крыма в состав Российской Федерации) 2014–2015 гг. произошло временное снижение объемов крымского вылова калкана, а в 2016–2018 гг. была увеличена его интенсивность (число ставных сетей относительно 2014–2015 гг. увеличилась более чем вдвое). В северо-западном районе Крыма, в уловах наблюдали увеличение доли молоди калкана (рыб длиной менее 40 и 40–45 см) и сокращение доли более крупных и взрослых рыб [Надолинский, 2018, Шляхов, 2019].

Таким образом, с середины 1970-х происходила чрезмерная эксплуатация почти всех локальных запасов калкана в Черном море, которая приводила к нарушению размерно-возрастной и половой структуры его популяции [FAO, 2020]. Общей проблемой причерноморских стран является браконьерский лов калкана. Изменения в экосистеме могут способствовать стрессовому состоянию популяции камбалы, в частности изменение планктонного сообщества и, как следствие, ухудшение кормовой базы личинок калкана, может приводить к аномалиям их развития и выживаемости. Так, в определённые периоды у взрослых особей черноморской камбалы наблюдали значительное количество аномалий пигментации, прохождения метаморфоза и остификации, что негативно сказывается на выживании популяции [Гирагосов, Ханайченко, 2007].

В связи с тем, что калкан – это ценный промысловый вид рыб и перспективный объект марикультуры, исследование эффективности реализации его нерестового потенциала имеет важное значение для оценки состояния его естественных популяций, так и для разработки биотехнологии его культивирования.

Эффективность естественного и искусственного воспроизводства рыб связана с качеством половых продуктов производителей, которое зависит от их биологических показателей и физиологического состояния [Рикер, 1979].

Качество гамет может сильно варьировать, так как оно находится под влиянием значительного числа абиотических и биотических факторов [Vobe, 2015]. Норма развития эмбрионов и личинок определяет выживаемость калкана на ранних стадиях развития. В целом, эффективность воспроизводства калкана в естественных и искусственных условиях зависит от комбинированного воздействия переменных биологических и гидрологических параметров.

1.1. Влияние биотических и абиотических факторов на характеристики спермы камбалы калкана и методы определения ее качества

Успех воспроизводства рыб, как при естественном, так и при искусственном нересте напрямую зависит от качества продуцируемой самцами спермы. Способность к оплодотворению определяется как количественными характеристиками: объемом и концентрацией сперматозоидов в сперме, так и ее качеством, а именно: составом (содержание ионов, липидов, белков), осмоляльностью и рН семенной жидкости, стабильностью мембран сперматозоидов, целостностью ДНК в них, а также скоростью и продолжительностью движения сперматозоидов.

Качество продуцируемой самцами спермы может зависеть также от множества факторов окружающей среды: сезонных изменений температуры, светового периода, солености воды и загрязнения химическими веществами.

Наиболее достоверной характеристикой качества сперматозоидов является успешность оплодотворения (при условии качественных женских гамет). Успешное оплодотворение происходит только в случае, если все клеточные функции сперматозоида работают синхронно. Дефекты клеточных систем у конкретного сперматозоида являются причиной отсутствия его фертильности и/или неспособности обеспечить последующее эмбриональное развитие [Holt, Van Look, 2004].

На успешность оплодотворения влияет множество факторов как в период до момента проникновения сперматозоида в микропиле икры, так и в процессе слияния его пронуклеуса с пронуклеусом яйцеклетки [Holt, Van Look, 2004, Yanagimachi, 2013].

Известно, что вклад «материнского» и «отцовского» фактора в развитие эмбрионов различен. Большая часть «материнского» эффекта определяется запасом питательных веществ в яйцеклетке, в то время как у сперматозоида возможность переноса питательных компонентов в яйцеклетку при оплодотворении ограничена. Показано, что жизнеспособность икры зависит и от качества спермы [Ottesen, 2007]. Качество спермы также оказывает влияние на жизнеспособность личинок на ранних этапах развития [Kroll, 2013; Siddique, 2017; Benini, 2018].

Влияние физиологического состояния самцов на качество их спермы.

Физиологическое состояние производителей оказывает непосредственное влияние на качество половых продуктов и приводит к изменениям нерестового поведения рыб [Сакун, 1968; Luquet, Watanabe, 1986; Devauchelle, 1988, Fauvel, 2010; Власов, 2017].

На химический состав спермы непосредственное влияние оказывает питание самцов [Luquet, Watanabe, 1986]. Важнейшими компонентами диеты являются витамины С, Е и каротиноиды, которые действуют как антиоксиданты. Антиоксиданты играют защитную роль для клеток во время сперматогенеза и положительно влияют на подвижность сперматозоидов. Присутствие антиоксидантов снижает риск перекисного окисления липидов, процесса, ингибирующего подвижность сперматозоидов. Следовательно, высокий уровень антиоксидантов в семенной плазме влияет на ее способность к оплодотворению и развитие эмбрионов. Показано, что подвижность сперматозоидов и их оплодотворяющая способность зависят от содержания докозагексаеновой и арахидоновой кислоты ненасыщенных жирных кислот в составе спермы [Ciereszko, 1995].

Уровни половых стероидных гормонов влияют на развитие гонад и качество спермы. Экспрессия рецепторов прогестерона положительно коррелирует с развитием гонад у самцов тюрбо во время репродуктивного цикла, и улучшает качество сперматозоидов, повышая долю подвижных сперматозоидов в эякуляте, продолжительность и скорость их движения [Feng, 2018]. Возраст самцов также может являться фактором, влияющим на фертильность [Dreanno, 1999].

Развитие семенников самцов калкана.

При диагностике функционального состояния репродуктивной системы рыб важное значение имеет выявление тех или иных отклонений от нормы. Нарушение в физиологии репродуктивных органов ведет не только к изменениям в процессах созревания половых продуктов, годичного полового цикла, но и к изменениям нерестового поведения, что влияет на качество воспроизводства рыб.

Семенники калкана – парные железы, расположены в каудальной части брюшной полости. Правая и левая железы не одинаковы по длине. Гонады – трехгранной формы. Хвостовой отдел железы уже головного. Головной отдел заканчивается тупым закруглением. Вдоль каждого семенника по центральной части проходит семенной проток. Снаружи семенники покрыты двухслойной оболочкой [Таликина, 1975].

По строению семенники калкана можно отнести к перкоидному типу, для которого характерна ориентация семенных ампул по радиусам от периферии к центру железы. Герминативная ткань семенников представлена половыми клетками. Семявыносящий проток состоит из нескольких сближенных каналов, стенки которых выстланы эпителиальными клетками [Таликина, 1975].

Для выделения стадий зрелости семенников у камбалы калкана учитывают определенный комплекс герминативных клеток, находящихся на разных этапах развития, а также анализ морфологических признаков: отношение веса половых желез (гонадосоматический индекс – ГСИ), формы гонад, выделение спермы при разрезе семенника и оплывание краев разреза, легкость выделения половых клеток из генипоры оболочкой [Таликина, 1975; Сакун, 1968].

Согласно М. Г. Таликиной [1975] в половом цикле самцов калкана выделяют шесть основных стадий развития половых желез. Стадия зрелости I характерна для неполовозрелых особей, возраст самцов 2–3 года, средние ГСИ – $0,16 \pm 0,04$ %; внешне пол различим, гонады малы по размеру, стекловидные, микроскопически герминативная часть железы представлена сперматогониями первого порядка. Стадия зрелости II характерна для неполовозрелых и половозрелых рыб: возраст рыб от 3 до 6 лет; ГСИ равен $0,31 \pm 0,06$; железы мутные непрозрачные;

характерно присутствие половых клеток в первой стадии сперматогенеза (сперматогониев). Стадия зрелости III характерна для половозрелых особей: возраст самцов калкана 5–10 лет, ГСИ в пределах 0,25–1,28; семенные каналцы сплошь заполнены цистами с семенными клетками, находящимися на разных стадиях сперматогенеза, просветы каналцев очень узкие, поэтому семенники на ощупь плотные, упругие; интенсивно протекают все стадии сперматогенеза – рост, созревание и формирование. К концу стадии III появляются группы зрелых сперматозоидов. Стадия зрелости IV довольно продолжительна: возраст – 5–10 лет; ГСИ равен 0,52–2,18, семенники молочно-белые; стадия характеризуется окончанием сперматогенеза – в каналцах семенника содержатся только зрелые сперматозоиды, вышедшие из цист, и крупные одиночные сперматогонии, представляющие запасный фонд половых клеток для повторения сперматогенеза уже в следующем сезоне. V стадия зрелости – характеризует нерестовое состояние самцов, т.е. текучесть половых продуктов; возраст рыб 4–8 лет, средний ГСИ – 0,99; семенники молочно-белые, мягкие на ощупь. На этой стадии образуется семенная жидкость, которая сильно разжижает массы сперматозоидов и вызывает их вытекание. Стадия зрелости VI – «выбой» – посленерестовое состояние половых желез; ГСИ снижен до 0,38, гонады самцов багрово-красные, дряблые; после 6-й стадии зрелости в семенниках снова начинается размножение сперматогоний, новая волна сперматогенеза, и семенники переходят во вторую стадию зрелости [Таликина, 1975; Сакун, Буцкая, 1986].

Нарушения в репродуктивной системе самцов рыб может происходить на клеточном, органном и тканевом уровне. Нарушения на уровне ткани – это локальные разрушения стенок семенных каналцев и образование полостей между ними; значительные локальные скопления форменных элементов крови в генеративной части гонад; концентрация жировой ткани между семенными каналцами; асинхронность сперматогенеза; замещение отдельных участков семенников тканью печени и наоборот. Нарушения на уровне органов: наличие разрастаний соединительной ткани соединительнотканых разрастаний в генеративной части

половых желез; возникновение опухолей, кист и других новообразований на поверхности семенников [Саун, Буцкая, 1986; Таликина, 1975].

При содержании в искусственных условиях период сперматогенеза у самцов калкана длится 6 месяцев. Однако некоторые самцы могут продуцировать сперму в течение 9 месяцев. В природных условиях период сперматогенеза длится 4 месяца. Период воспроизводства у самцов камбалы длится дольше у самцов, чем у самок [Таликина, 1975].

Продолжительность периода продуцирования спермы может быть связана с ритмом сцеживания в искусственных условиях: самый короткий период был отмечен у еженедельно сцеживаемых самцов и самый длинный у ежемесячно сцеживаемых животных [Саун, Буцкая, 1986; Таликина, 1975].

Одной из причин растянутого нереста самцов может являться неодновременное освобождение семенных ампул от зрелой спермы. С другой стороны, длительность нерестового периода для всей популяции объясняется тем, что самцы подходят на нерест неодновременно: в соответствии со степенью физиологической подготовленности рыб к участию в нересте [Саун, Буцкая, 1986].

Оценка изменения характеристик спермы в течение сезона нереста черноморской камбалы калкана до настоящего времени не проводилась.

Сперматогенез.

Сперматогенез – процесс, в результате которого после серии сложных преобразований стволовой сперматогоний становится зрелой, полностью дифференцированной подвижной гаметой – сперматозоидом.

Ошибки на любом этапе развития могут привести к снижению качества и количества сперматозоидов [Mylonas, 2010] цитируется по [Liu, 2021].

Анализ гонад самцов камбалы тюрбо, с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии показал наличие разных типов мужских половых клеток на разных стадиях развития гонад [Liu, 2021], описание морфологии которых приводятся ниже (Рисунок 2).

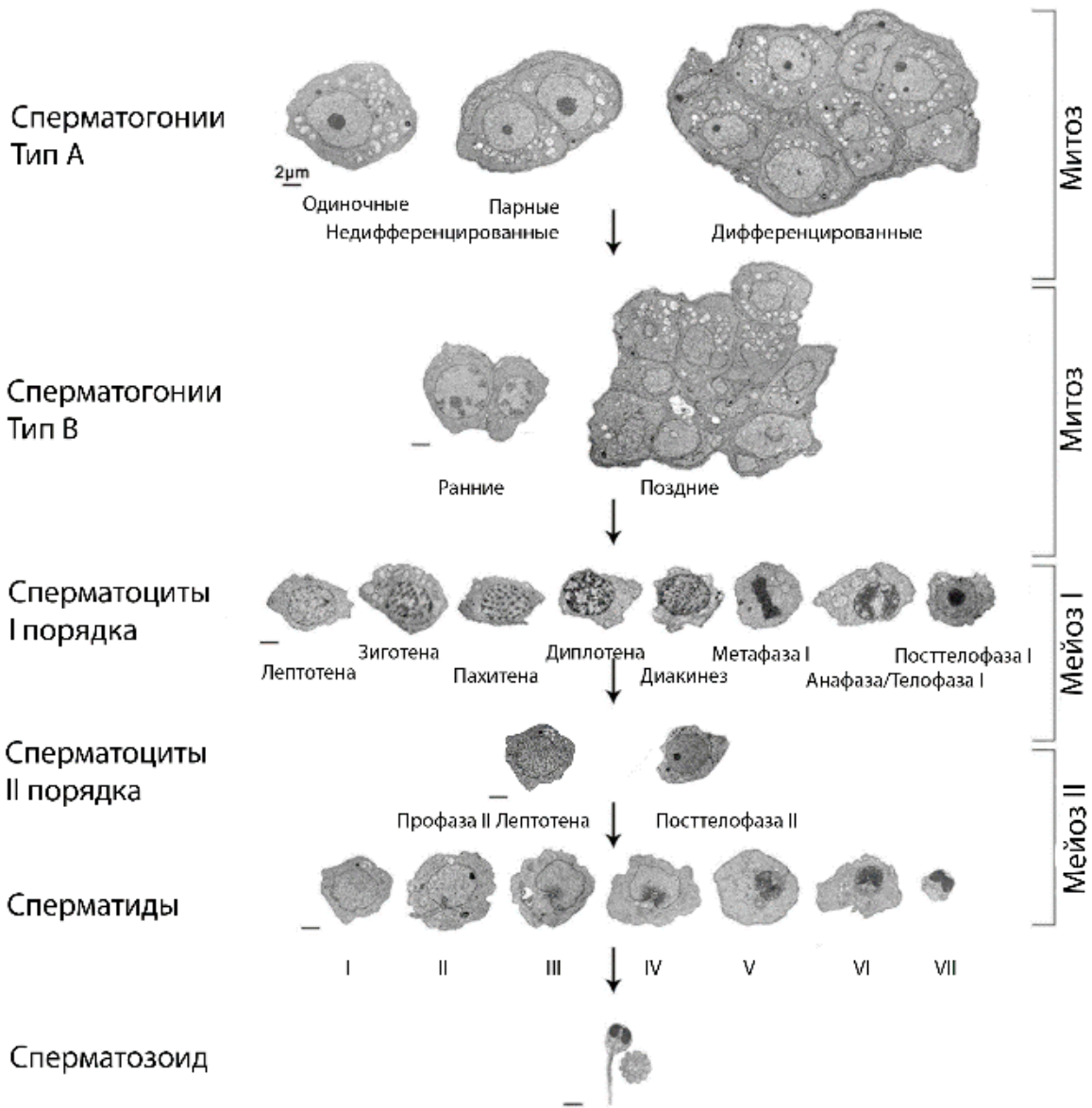


Рисунок 2 – Стадии сперматогенеза тюрбо по [Liu, 2021]

Сперматогонии Тип А

Одиночные недифференцированные сперматогонии. Самые большие половые клетки (диаметр $12,4 \pm 0,74$ мкм) содержат большое ядро с четкими границами ядерной мембраны и 1–2 явными крупными ядрышками. Цитоплазма недостаточно дифференцирована, неправильной формы. Вокруг ядра присутствует большое количество митохондрий. Каждый недифференцированный одиночный сперматогоний обернут одной или двумя клетками Сертоли. Недифференцированные сперматогонии типа А (парные), очень похожи на одинарные, но меньше (диаметр $10,12 \pm 1,33$ мкм). Дифференцированные спермато-

гонии типа А содержат 6–8 клеток (диаметр $9,36 \pm 0,89$ мкм), размер меньше, чем у парных сперматогоний, граница ядерной мембраны четкая, цитоплазма содержит большое количество митохондрии.

Сперматогонии типа В

Ранние сперматогонии типа В: Сперматоцит содержит 16 или более клеток. Ядро овальной формы, в нем содержится гетерохроматин и 1–2 мелкие нуклеолы. Далее число клеток увеличивается, их размер уменьшается, такие сперматогонии называют поздними.

Сперматоциты I порядка

Лептотена первая стадия первой профазы мейоза, при которой хромосомы становятся видимыми как отдельные тонкие и длинные нити. В течение этой фазы происходит репликация хромосом.

Зиготена. Парные гомологичные хромосомы образуют синаптонемный комплекс.

Пахитена. Стадия толстых нитей, во время этой фазы завершается формирование синаптонемного комплекса, несестринские хроматиды гомологичных хромосом начинают кроссинговер.

Диплотена Синаптонемный комплекс исчезает. Гомологические хромосомы начинают раскручиваться для разделения. Хромосомы укорачиваются.

Диакинез. Хромосомы становятся еще короче, начинают равномерно распределяться в ядре и смещаться к периферии ядра.

Метафаза I (диаметр $5,09 \pm 0,39$ мкм) Ядрышко исчезает, ядерная оболочка распадается, и хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости.

Анафаза/Телофаза I. Две гомологичные хромосомы двухвалентных тел разделяются и движутся к полюсам клетки. Достигнув полюсов, хромосомы раскручиваются в нити. Затем ядерная мембрана восстанавливается и цитокинез продолжается.

Посттелофаза I Ядерная мембрана перестроена, сформировано большое ядро.

Сперматоциты II порядка

Профаза II Лептотена. Клетка становится меньше, чем во время профазы I Лептотена, хроматин нитевидный и затемненный.

Посттелофаза II Мейоз II завершается, ядерная мембрана восстанавливается.

Сперматиды.

Сперматиды I. В ядре появляется небольшое количество гетерохроматина, окраска вокруг двухслойной ядерной мембраны постепенно углубляется. Зарождающийся жгутик еще не сформирован.

Сперматиды II (диаметр $5,81 \pm 0,46$ мкм). Сперматиды имеют неправильную форму, а их двухслойная мембранная структура четко обозначена, в цитоплазме находится большое количество митохондрий и везикул. В ядре около клеточной мембраны образовывается ранний centrosомный комплекс, состоящий из проксимальной центриоли, межцентриолярного тела и дистальной центриоли. Жгутик клетки (форма «9 + 2») расширяется в основании проксимальной центриоли, и образует первоначальный хвост сперматозоида. Сперматиды III Сперматиды имеют неправильную форму, увеличиваются в размерах. Комплекс centrosом становится более зрелым. Основание хвоста сперматозоида углубляется в ядро (около $1/3$ ядра), образуя имплантационную ямку. Хроматин начинает концентрироваться по направлению к хвосту сперматозоида.

Сперматиды IV (диаметр $6,53 \pm 0,57$ мкм) Комплекс centrosомы поворачивается. Угол между проксимальной и дистальной центриолями исчезает. Ямка имплантации углубляется глубже в ядро (примерно на $1/2$ ядра). Жгутик и клеточная мембрана на краю ядра образуют узкую полость, которую называют центральным пространством рукава. Примерно 8–9 плотных линейных веществ, аккуратно расположены в цитоплазме вокруг передней части жгутика – жгутиковый сателлитный комплекс. Ядро концентрируется в сторону хвоста, в цитоплазме появляются крупные митохондрии, которые постепенно перемещаются к основанию хвоста.

Сперматиды V Электронная плотность хроматина в ядре значительно увеличивается. Хроматин резко конденсируется и превращается в крупные частицы, а объем ядра значительно уменьшается, что приводит к предварительному образо-

ванию ядра сперматозоида. У основания хвоста собираются крупные митохондрии. Везикулы продолжают увеличиваться и вакуолизировать в других областях цитоплазмы (остаточное тело).

Сперматиды VI Электронная плотность хроматина продолжает увеличиваться, и образуются 2–3 слоя ядерной мембраны. Большие митохондрии собираются вокруг основания хвоста. Деформация остаточного тела усиливается, а остаточные тела начинают двигаться к хвосту и постепенно отделяются от основной сперматиды.

Сперматиды VII. Ядро дополнительно сконцентрировано, но частичные вакуоли все еще наблюдаются. Объем митохондрий увеличен до максимума.

Сперматозоид. Диаметр клетки $2,08 \pm 0,06$ мкм. Ядро сконцентрировано в однородное вещество с высокой электронной плотностью, в котором можно наблюдать рассеянные вакуоли. Остаточные тела полностью отделяются, митохондрии полностью собираются. Сперматозоид близкородственного калкану тюрбо содержит не менее 16 сферических митохондрий. [Liu, 2021].

Результаты исследований развития гонад тюрбо [Feng, 2018] показали, что в период нерестового сезона часть сперматоцитов дифференцируется в сперматиды и гонады переходят от стадии III на стадию IV, затем часть сперматид дифференцируется в сперматозоиды, и гонады переходят на стадию V, а к окончанию нерестового сезона в гонадах (VI стадия) находятся преимущественно первичные и вторичные сперматоциты.

Ввиду сходства биологии видов предполагается, что аналогичное развитие половых клеток на соответствующих стадиях развития гонад происходит у черноморского калкана.

Строение и характеристики подвижности сперматозоидов.

Сперматозоид – это высокоспециализированная клетка, которая потеряла большинство «обычных» клеточных органелл во время своей дифференцировки; оставшиеся структуры включают ядро, митохондрии и некоторые специфические структуры, такие как комплекс жгутика и базального тела. Жгутик сперматозоида выполняет две основные функции: двигательную и рулевую, обеспечивая по-

движность и ориентацию сперматозоида. Головка сперматозоида активно не участвует в его передвижении и остается полностью пассивной, являясь переносчиком генетической информации [Cosson, 2019].

Структура сперматозоидов камбал р. *Scophthalmus* аналогична таковой у большинства костистых рыб (Рисунок 3). Округленное ядро (максимальный диаметр 1,7 мкм), уменьшенная средняя часть и структура жгутика (хвостика), отсутствие акросомы указывает на то, что сперматозоид камбалы можно отнести к примитивному типу. Углубление, наблюдаемое в передней части головки сперматозоида тюрбо не было обнаружено у других рыб. [Suquet, 1994]. Головка сперматозоидов тюрбо вдавлена сзади глубже, чем спереди. Хроматин выглядит зернистым, его концентрация изменяется у разных сперматозоидов. Обе центриоли находятся в «задней» инвагинации.

Изгиб жгутика создается высокоорганизованной цилиндрической системой микротрубочек, называемой аксонемой, исходящей из базального тела. Аксонема «9 + 2» состоит из девяти пар периферических дублетов микротрубочек и одной центральной пары синглетных микротрубочек [Suquet, 1993; Dreanno, 1999]. Аксонемы представляют собой сложные структуры, состоящие по крайней мере из 500 различных белковых компонентов. Периферические дублеты пронизаны двумя рядами динеиновых плеч по всей длине микротрубочек. Эти «динеиновые плечи» состоят из макромолекулярного комплекса АТФазы и представляют собой основной двигатель, приводящий в действие всю аксонему [Cosson, 2019].

Качество сперматозоида зависит от правильного развития всех его элементов [Cosson, 2019]. Плазматическая мембрана сперматозоидов играет важную роль в активации подвижности, реагируя на ионные изменения, ответственные за начало колебаний жгутиков при попадании в активирующую среду. Поскольку у сперматозоидов костистых рыб нет акросомы, плазматическая мембрана участвует в слиянии сперматозоида и икринки. Некоторые белки, локализованные в головке сперматозоида, способствуют процессу оплодотворения.

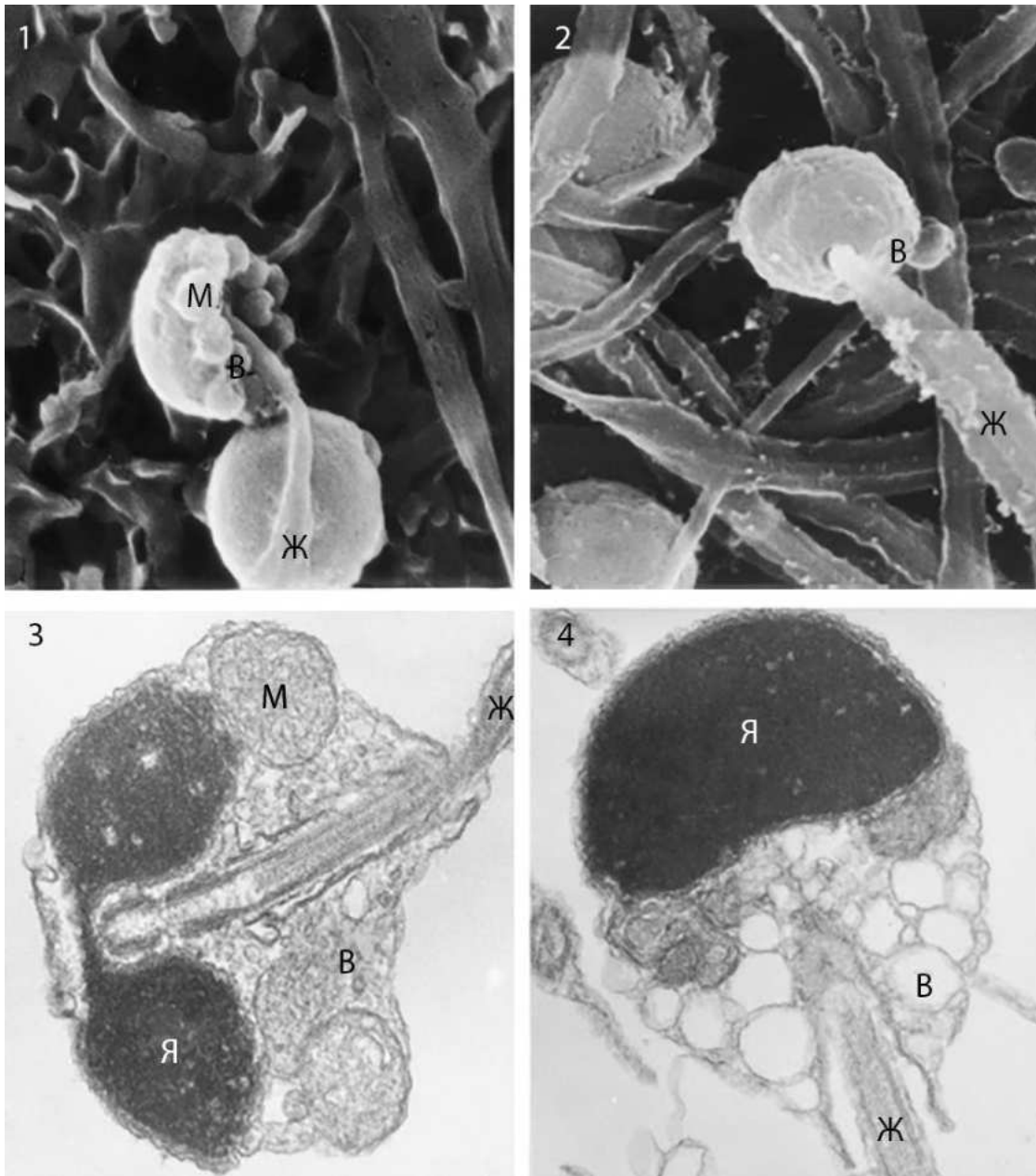


Рисунок 3 – Структура сперматозоида камбалы до (1, 3) и после активации (2, 4) подвижности (заимствовано из Dreanno, 1999 по разрешению авторов). Изображения неактивированного сперматозоида, полученные с помощью СЭМ (1, 3) кольцо митохондрий (М), муфтообразная структура, состоящая из визикул (В) и жгутик (Ж), 17 000; с помощью ТЭМ: двулопастное ядро (Я), сферические митохондрии (М), везикулы (В) и жгутик (Ж), 20 000. (с) Активированные сперматозоиды (SEM) с округлой средней частью (стрелка) и жгутиком (Ж), 15 000. Изображения активированного сперматозоида СЭМ (2) и ТЭМ (4)

Принято считать, что разные типы белков ядра определяют степень конденсации хроматина, которая в свою очередь, повышает устойчивость ДНК к химическим или механическим повреждениям [Beck, 1992]. Правильно «собранная» аксонема обеспечивает эффективное движение сперматозоида.

Подвижность – важнейшая функция сперматозоида, благодаря которой он способен приблизиться к женской гамете и проникнуть в нее. У рыб с внешним оплодотворением сперма остается неподвижной в половых путях самцов до тех пор, пока не попадет во внешнюю изотоническую среду (морскую воду).

Движение сперматозоидов обеспечивается колебательными движениями его жгутика. Сам жгутик реагирует на большое количество внешних и внутренних сигналов, которые контролируют его аксонему, обеспечивая активацию, ускорение, замедление или переориентацию всего сперматозоида [Cosson, 2019].

У большинства, изученных к настоящему времени, видов рыб движение жгутика сперматозоидов проходит пять коротких последовательных этапов [Vorshpolets, 2018].

Этап 1. Сразу после начала подвижности по всей длине жгутика проходят волны с постоянной амплитудой и высокой частотой.

Этап 2. В течение короткого периода подвижности сперматозоиды способны реагировать на внешние сигналы. Например, при приближении сперматозоида к какой-либо поверхности меняется характер движения его жгутиков, а именно переходит от спирального к более плоскому типу движения. Некоторых химические вещества могут вызвать асимметричный поворот или переворачивание жгутиков и изменение направления движения сперматозоидов.

Этап 3. На следующем этапе происходит уменьшение частоты биений жгутика в результате снижения внутренней концентрации АТФ, волны имеют меньшую амплитуду, на кончике жгутика начинают сильно выражаться и смещаются к проксимальной части жгутика

Этап 4. Осмотическое повреждение может приводить к появлению петель и пузырей на жгутике.

Этап 5. Подвижность полностью останавливается, волновое движение жгутика практически прекращается, жгутик выпрямляется. На этой последней стадии концентрация АТФ внутри жгутика, достигает порогового уровня, который настолько низок, что динеин-АТФазы больше не активируются, и биения прекращаются.

Активированные сперматозоиды, приводимые в движение жгутиком, перемещаются по кривой, имеющей характер спирали, в редких случаях наблюдают прямолинейное движение. Скорость движения сперматозоидов положительно коррелирует с показателями их оплодотворяющей способности [Holt, Van Look, 2004; Cosson, 2019]. Для осуществления оплодотворения, необходимо, чтобы сперматозоиды были способны к поступательному движению и, подплыв к микропиле икринки, могли проникнуть через него к протоплазматической мембране ооцита для оплодотворения. Колебательные движения сперматозоида без поступательного движения не обеспечивают оплодотворения [Гинзбург, 1968; Cosson, 2019].

Наиболее точными параметрами для оценки качества спермы рыб являются скорость движения по криволинейной дистанции и процент подвижных сперматозоидов [Rurangwa, 2004]. Доказано, что высокий процент подвижности сперматозоидов связан с успешным оплодотворением икры [Gallego, 2018]. В целом, качественная сперма должна содержать не менее 80 % подвижных сперматозоидов, хотя значения этого параметра могут значительно варьировать у разных особей и видов рыб [Kowalski, 2019]. Как правило, сперматозоиды с более высокой скоростью и подвижностью имеют преимущество в скорости достижения микропиле икринки, что имеет решающее значение для рыб, нерестящихся в условиях жесткой конкуренции [Cosson, 2008].

На способность к оплодотворению влияет и продолжительность активности спермы. После активации сперматозоидов морской водой, внутренние концентрации ионов и осмотическое давление восстанавливаются, оказывая повреждающее действие на мембрану сперматозоида и ограничивая период его подвижности. Продолжительность подвижности – это компромисс между

уровнем энергетических запасов, которыми обладает клетка, и процессом осмотического повреждения, испытываемого этой клеткой [Cosson, 2019].

В литературе присутствуют противоречивые данные по длительности активности спермы атлантического тюрбо, активированной разными способами и в разной среде. Для атлантического тюрбо показано, что подвижность сперматозоидов сохраняется на протяжении 1 мин [Chauvaud, 1995]; 10 мин [Suquet, 1995; Dreanno, 1999] до 60 мин [Geffen, 1993]. В работе [Chauvaud, 1995] авторы выделяют четыре последовательные фазы подвижности сперматозоидов тюрбо: фаза 1 длится 40 с, характеризуется высоким процентом подвижных сперматозоидов с частотой биения хвостика около 50 Гц, фаза 2 характеризуется внезапным снижением подвижных клеток до 30 % с частотой биения хвостиков 15–30 Гц до 40 с после активации, фаза 3: напряжение дистальной части хвостика, фаза 4: начинается после 80 с и характеризуется постепенным прекращением движения сперматозоидов, напряжение хвостика по всей длине.

При использовании методики однократного разбавления морской водой (~32–35 % в соотношении 1:40) свежеразбавленная сперма атлантического тюрбо содержала в среднем 76 % активных сперматозоидов, их доля снижалась до 70 % через 15 минут после активации, и до 48 % через час после активации, сохраняя подвижность на уровне в среднем 63 % (с вариациями от 40 до 80 % от первоначальной активности) [Geffen, 1993], причем между уровнем АТФ, активностью и продолжительностью сохранения подвижности сперматозоидов после активации не было обнаружено значимой корреляции. Оплодотворяющая способность спермы тюрбо снижалась с 97 до 94 % через 3 и 15 мин после разбавления морской водой (~32 ‰), соответственно, т.е. от 3 до 15 минут после разбавления спермы тюрбо, снижение возможности к оплодотворению активированных сперматозоидов происходит всего на 3 % [Barton, 1981], аналогично снижению подвижности сперматозоидов тюрбо за тот же период времени. Однако, при более длительном хранении спермы разбавленной морской водой – до 28 мин процент оплодотворения снижался до 22 %. [Geffen, 1993]. Для экспериментально выращенных самцов черноморского калкана, было показано,

что $92,4 \pm 3,8$ % сперматозоидов спермы оставались подвижными после активации; длительность подвижности разбавленной спермы – 30 ± 2 мин [Polat, 2014].

При применении двухступенчатого протокола активации спермы атлантического тюрбо [Billard, 1992] производили последовательное разбавление эякулята неактивирующей средой – низкоосмотических неионных растворах в соотношении 1:24 и затем активирующей средой в соотношении 1:24 в высокоосмотических неионных растворах (изотоничным морской воде солёностью 32–35 ‰) при конечном разбавлении спермы растворителями 1:576; при этом происходила одновременная активация почти 100 % сперматозоидов, и их скорость через 20 с после активации составляла около 200 мкм/с, однако очень быстро снижалась, и через 1 мин после активации падала до 100 мкм/с [Dreanno, 1999].

Работы по оценке репродуктивных характеристик самцов черноморского калкана ведутся с 1970-х гг. Подробно был изучен сперматогенез и половой цикл самцов калкана [Таликина, 1975]; исследованы эколого-физиологические особенности стимуляции овуляции и спермиации с помощью инъекций гипофиза [Туркулова, 2012]. Однако характеристики подвижности сперматозоидов черноморского калкана из естественных популяций остаются практически не изученными.

Способность к активации и подвижность сперматозоидов в зависимости от биотических и абиотических факторов.

Множество физических и химических факторов, таких как температура, солёность, осмотический шок, изменения напряжения O_2 , CO_2 в окружающей среде, pH, концентрация тяжелых металлов регулируют инициацию активации спермы. В сперматозоидах рыб внешние сигналы, запускающие активацию подвижности, действуют на уровне плазматической мембраны, гиперполяризации/деполяризации мембраны и активности ионных каналов или аквапоринов [Cosson, 2010, 2019].

Осмотическое давление и осмоляльность.

У рыб с внешним оплодотворением во время нереста сперматозоиды перемещаются к икре током морской воды. Каждый отдельный сперматозоид попадает в среду с высоким содержанием ионов, которые образуют высокое осмолярное давление по сравнению с цитоплазмой спермиев.

У морских рыб осмоляльность семенной жидкости значительно ниже, чем осмоляльность морской воды. Концентрация сперматозоидов в сперме обычно достаточно высока, и неподвижность сперматозоидов в сперме, по-видимому, связана с недостатком кислорода и высокой концентрацией углекислого газа. Инициация подвижности спермиев возможна при небольшом разбавлении спермы морской водой. Процессы активации в морской воде полностью обратимы на начальных этапах при условии устранения осмолярного градиента.

Инициация подвижности происходит практически мгновенно (100 мс или меньше) [Nadi Alavi, 2019]. Для полной активации спермы атлантического тюрбо достаточно 10% объема воды для разбавления семенной жидкости. В условиях марикультурных хозяйств, при искусственном отборе, сперма в процессе сцеживания может быть разбавлена незначительным количеством урины, которая оказывает негативное влияние на подвижность сперматозоидов [Dreanno, 1998].

Толерантность подвижности сперматозоидов к осмолярности зависит от вида рыб. Так, у вида камбалообразных *Limanda yokohamae* активное движение сперматозоидов происходит при 15–35 ‰. [Cosson, 2004]. Подвижность спермы атлантического тюрбоактивируется разбавлением в среде изотоничной по отношению к семенной жидкости (306 ± 6 мосмоль/кг) [Dreanno, 1999]

На подвижность сперматозоидов влияет внешняя и внутренняя концентрация ионов кальция. Приток Ca^{2+} через плазматическую мембрану является общим механизмом ионных сигналов, который использует фактически безграничный внеклеточный запас Ca^{2+} в морской воде, который может достигать концентрации 11 ммоль/л. Жгутик сперматозоида может изменять характер биения в ответ на изменение концентрации Ca^{2+} [Brokaw, 1976]. Дополнительные сигналы, такие как фосфорилирование белка, влияют на регулирование подвижности жгутика

[Inaba, 2003 a, 2003 b], но эти процессы мало изучены для сперматозоидов морских рыб [Inaba, 2008]. Изменения формы жгутика, напряжение дистальной части, могут быть результатом тонкого регулирования белков центральной пары микротрубочек (HYDIN) [Inaba, 2008].

CO₂ и митохондриальное дыхание.

Энергетический метаболизм – один из важных факторов, управляющий функциональной активностью сперматозоидов. Митохондриальное дыхание играет ключевую роль в подвижности спермы некоторых видов животных, в частности у рыб. Частота дыхания сперматозоидов камбалы тюрбо выше, чем у других костистых рыб. Потребление кислорода неподвижных (инактивированных) сперматозоидов тюрбо в иммобилизирующей среде составляет 35 нмоль O₂ /10⁹ сп./мин., в то время как сперматозоиды радужной форели и трески тратят 1,5–3,0 нмоль O₂ /10⁹ сп./мин [Inaba, 2003b].

Энергия, необходимая для движения хвоста сперматозоида, выделяется в ходе окислительной фосфорилизации эндогенных фосфолипидов единичной митохондрии, локализованной в шейке хвоста спермиальной клетки. Концентрация CO₂ является определяющим иммобилизирующим фактором в семенной жидкости: в среднем концентрация CO₂ в ней составляет от $8,97 \pm 1,53$ ммоль/л или $8,66 \pm 1,48$ мг-экв / л HCO₃ (при pH от $7,58 \pm 0,03$), pCO₂ – $6,74 \pm 1,15$. Поступление углекислого газа вызывает обратимое прекращение движения, останавливая генерацию новых биений хвоста [Inaba, 2003 b].

Митохондриальное дыхание сперматозоидов тюрбо может быть лимитировано концентрацией кислорода в субстрате. Поступление энергии, необходимой для подвижности сперматозоида, частично обеспечивается митохондриальной активностью. Процент подвижных клеток, длительность подвижности и поступательная скорость зависят от присутствия ингибиторов дыхания (KCN, NaHCO₃, олигомицина и NaN₃), которые блокируют энергию синтеза через митохондриальное дыхание или фосфорилиацию. Блокировка дыхания осуществляется накоплением АДФ и АМФ, создающим дисбаланс между катаболизмом и анаболизмом АТФ. Подвижность сперматозоидов тюрбо зависит главным образом от эндоген-

ного содержания АТФ, накопленной заранее в гонадах и/или генитальном тракте, а не АТФ, полученной в результате митохондриальной фосфорилиции в течение подвижной фазы. Высокая эффективность окислительной фосфорилиции, позволяет сперматозоидам тюрбо поддерживать достаточно длительную подвижность [Inaba, 2003 b].

Физиология сперматозоидов тюрбо является уникальной для костных рыб из-за своих специфических характеристик подвижности и чувствительности к CO_2 в течение периода подвижности.

Объем продуцируемой спермы и ее концентрация.

Наличие большого числа сперматозоидов в эякуляте и активная подвижность сперматозоидов позволяет занять максимально возможный водный объем, увеличивая вероятность контакта спермы с икрой. Показано, что объем эякулята самцов рыб коррелирует со множеством факторов: размерами самца, продолжительностью периода его участия в нересте и количеством продуцируемых им порций спермы [Cosson, 2008].

Из множества сперматозоидов, попавших в зону досягаемости икринки, только один проходит через микропиле, которое открывается для сперматозоида на короткий период (менее 2 мин). Таким образом, у рыб с внешним оплодотворением селекция сперматозоидов происходит на нескольких уровнях.

Концентрация сперматозоидов – важнейший показатель качества спермы, отражающий оплодотворяющую способность спермы. Благодаря оптимальному соотношению количества сперматозоидов на икринку обеспечивается наилучшее оплодотворение. Для коммерческого производства при искусственном оплодотворении икры атлантического тюрбо рекомендована минимальная доля соотношения 6×10^3 сперматозоидов на икринку и время контакта между гаметами 3 минуты [Suquet, 1995].

Для самцов атлантического тюрбо были зарегистрированы такие характеристики спермы: объем выпускаемой спермы – 0,2–2,2 мл, концентрация (0,7– $11,0 \times 10^9$ сп./мл и общее количество спермы при сцеживании – 0,2– $12,0 \times 10^9$ сперматозоидов [Suquet, 1994, Chauvaud, 1995].

Единственно известными характеристиками спермы черноморского калкана, являются данные для экспериментально выращенных 8-летних самцов (Институт Трабзон) длиной $50,5 \pm 0,5$ см, весом $2,4 \pm 0,1$ кг [Polat, 2014], у которых объём сцеживаемой спермы составлял $4,05 \pm 0,3$ мл; концентрация сперматозоидов в эякуляте – $2,2 \pm 0,14 \cdot 10^9$ сп. мл⁻¹; рН = $7,17 \pm 0,03$.

Влияние состава семенной жидкости на активность сперматозоидов.

Ионный состав спермы обычно препятствует подвижности сперматозоидов рыб в половых путях [Stoss, 1983, Billard, 1986]: Семенная жидкость не только поддерживает неподвижность сперматозоидов, но и защищает их от разрушения [Cosson, 2010, 2019]. Было показано, что в гонадах камбал происходит уменьшение концентрации O_2 и повышается концентрация CO_2 , вследствие высокой концентрации сперматозоидов в эякуляте [Inaba, 2003 b]. Способность сперматозоидов к движению зависит от степени их созревания в половых путях самца до момента эякуляции. В свою очередь созревание контролируется гормональным путем и регулированием концентрации ионов в семенной жидкости.

Компоненты семенной жидкости продуцируются клетками Сертоли, соматическими клетками, находящимися в гонадах и половых протоках самцов рыб. Эти компоненты представляют собой органические и неорганические соединения, которые поддерживают и защищают жизнеспособность и оплодотворяющую способность сперматозоидов, пока они находятся в гонадах. Как только сперматозоиды попадают из семенников в семявыносящие протоки, они приобретают потенциал для инициации подвижности и оплодотворения в семенной плазме. Этот процесс контролируется гормонами системы гипоталамус-гипофиз. Во время нереста гипоталамус производит гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ), который запускает производство и секрецию лютеинизирующего гормона (ЛГ) гипофизом. ЛГ индуцирует выработку прогестинов в сперматозоидах, что приводит к увеличению рН семенной жидкости и внутриклеточной концентрации цАМФ в сперматозоидах.

У разных видов рыб различается ионный состав семенной плазмы, но Na^+ , K^+ и Cl^- являются преобладающими ионами в плазме как пресноводных, так и

морских рыб. Остается открытым вопрос о наличии взаимосвязи между ионным содержанием семенной плазмы и подвижностью или оплодотворяющей способностью сперматозоидов рыб. Для карпа (*Cyprinus carpio*) зарегистрирован высокий процент подвижных сперматозоидов после 72 часов инкубации в искусственной семенной плазме, содержащей повышенное содержание Na^+ и 40 мМ K^+ (более высокие или более низкие концентрации K^+ приводили к снижению подвижности сперматозоидов). Это говорит о том, что ионы K^+ в семенной плазме играют решающую роль в поддержании потенциала подвижности сперматозоидов крапов. Отношения ионов Na^+ / K^+ и соотношение $\text{Ca}^{2+} / \text{K}^+$ влияют на длительность подвижности сперматозоидов [Alavi, 2019]. Например, у осетровых высокая, по сравнению с другими костистыми рыбами, продолжительность подвижности сперматозоидов связана с более высокими отношениями Na^+ / K^+ и $\text{Ca}^{2+} / \text{K}^+$ в семенной плазме [Linhart, 2003]

Следует отметить, что состав семенной жидкости у рыб различен, отражает межвидовые или внутривидовые вариации и находится под влиянием различных эндогенных и экзогенных факторов, таких как возраст, питание, температура и т. д.

Влияние овариальной жидкости на подвижность сперматозоидов.

Взаимодействие между сперматозоидами, икрой и окружающими жидкостями (т.е. активирующий раствор, овариальная и семенная жидкость) имеют решающее значение при оплодотворении, особенно для тех видов рыб, у которых существует высокая конкуренция сперматозоидов [Billard, 1986, Holt, Van Look, 2004].

Содержание химических веществ в овариальной жидкости варьирует среди самок одного вида и различается среди рыб разных видов. Влияние ионов овариальной жидкости на функции сперматозоидов изучены слабо. Известно, что концентрации Ca^{2+} в овариальной жидкости отрицательно коррелируют с подвижностью и скоростью сперматозоидов атлантической трески. Для сперматозоидов чавычи, показано отрицательное действие ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на длительность активности сперматозоидов, в то время как процент подвижных клеток

положительно коррелирует с концентрацией Mg^{2+} в овариальной жидкости. У радужной форели овариальная жидкость с высокими концентрациями ионов K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} не активировала движения сперматозоидов, в то время как в овариальных жидкостях с низкой концентрацией Na^+ сперматозоиды активировались. Отмечено подавляющее действие овариальной жидкости на подвижность сперматозоидов с высоким содержанием ионов K^+ [Dreanno, 1999].

В овариальной жидкости самок тюрбо содержание ионов Na^+ находится в пределах от 203,3 до 213,7 мМоль/л, K^+ от 9,6 до 12,8, Cl^- от 153,3 до 172,7 мМоль/л, Ca^{2+} от 2,5 до 2,7 мМоль/л, pH 7,5 до 8 [Jia, 2015].

Содержание определенных белков (например, C3 и C4) могут влиять на характеристики сперматозоидов. Для атлантической трески, повышенный уровень белка отрицательно коррелирует со скоростью сперматозоидов. Кроме того, неидентифицированные белки, присутствующие в овариальной жидкости, могут влиять на скорость сперматозоидов. Высказываются предположения, что на уровне женских гамет существует возможность «распознавания» и отбора сперматозоидов. Только небольшая часть сперматозоидов, достигнувших икринки, способна определить местонахождение микропилле на ней и именно тот сперматозоид, который первым вошел в микропиле, попадает в ее цитоплазму и активирует развитие икринки [Yanagimachi, 2013].

Овариальная жидкость может увеличивать эффективность движения сперматозоидов. Так, показано, что скорость сперматозоидов глазчатого губана *Symphodus ocellatus*, европейского морского языка *Solea senegalensis* и атлантической трески *Gadus morhua* увеличивается в присутствии овариальной жидкости. Анализ характера биения жгутиков сперматозоидов чавычи, показал, что овариальная жидкость положительно влияет на биомеханику их движения. Активность сперматозоидов также может зависеть от индивидуальных особенностей овариальной жидкости конкретной самки. Так в экспериментах [Rosengrave, 2008] характеристики движения сперматозоидов чавычи от одного самца достоверно отличались в зависимости от того, от какой самки была использована овариальная

жидкость для активации, подобные результаты получены и для арктического гольца [Urbach, 2005].

С другой стороны, овариальная жидкость может отрицательно влиять на характеристики сперматозоидов. Например, у радужной форели овариальная жидкость от определенных самок ингибирует подвижность сперматозоидов, в то время как от других инициирует их подвижность [Wojtczak, 2007]. Интересно, что у атлантической трески сперматозоиды от пойманных в дикой природе самцов подверглись отрицательному воздействию овариальной жидкости от самок, выращенных на фермах [Beirao, 2014].

У многих видов рыб икринки выделяют вещества, усиливающие подвижность сперматозоидов и/или их «притягивание» в непосредственной близости от икринки. Например, икра тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* выделяет белки, активирующие сперму. Феномен притяжения сперматозоидов к микропиле икринки у разных видов рыб различен, однако общей чертой является то, что аттрактант микропиле активирует сигнальный механизм Ca^{2+} в сперматозоидах и инициирует их подвижность. Вероятно, существует большее количество белков, участвующих в этом процессе и их функции все еще не определены. В литературе присутствуют данные о содержании у различных видов рыб органических компонентов в овариальной жидкости, таких как метаболиты и ферменты. Так у атлантического тюрбо фертильность была высокой в середине сезона, и это было связано с высоким уровнем щелочной фосфатазы и низким уровнем кислой фосфатазы и аспаратаминотрансферазы [Zadmajid, 2019].

Сперматозоиды рыб, при движении к икринке в естественной среде, могут попадать в условия с разными концентрациями овариальной жидкости. Эти концентрации определяют степень влияния физических и химических свойств овариальной жидкости на их активность. Скорость и продолжительность движения сперматозоидов может изменяться в зависимости от процентного соотношения овариальной жидкости и активирующей среды. У радужной форели с увеличением концентрации овариальной жидкости наблюдали увеличение скорости и процента подвижных сперматозоидов [Kanuga, 2012].

Так у трехиглой колюшки длительность активности сперматозоидов составляла 10 минут при разведении овариальной жидкости 0,75–3,13 %, 1 час в 6,25 % и до 10–24 часа при 12,5–50 % [Dietrich, 2007]. Стопроцентный раствор овариальной жидкости не увеличивал характеристики подвижности сперматозоидов, в связи с тем, что клетки не подвергались осмотическому шоку.

Интересно, что у гуппи [Cardozo, 2018] качество овариальной жидкости зависело от питания самок и скорость сперматозоидов была значительно ниже в овариальной жидкости голодающих самок.

На характеристики движения сперматозоидов может влиять и вязкость овариальной жидкости, которая варьирует в зависимости от стадии зрелости яиц и обычно в 2–3 раза выше, чем вязкость морской воды. Овариальная жидкость может действовать как хемоаттрактант для сперматозоидов [Zadmajid, 2019].

Таким образом, биохимия овариальной жидкости рыб, которая зависит от состояния самки, особенностей питания и определенных условий их обитания, оказывает существенное влияние на микросреду нереста, и, следовательно, на свойства сперматозоидов.

Влияние температуры воды на активность сперматозоидов рыб.

В литературе присутствуют разрозненные данные об изменениях функциональных параметров сперматозоидов рыб при различных температурах. Любое увеличение и снижение температуры в местах обитания рыб оказывает значительное влияние на их общий обмен веществ и, следовательно, на их репродуктивную эффективность. Нижний и верхний диапазоны температур, а также оптимальная температура для различных видов рыб сильно варьируют.

Изменения климата могут вызывать колебания температуры окружающей среды, что также оказывает влияние на эффективность нереста. От температуры воды зависит созревание сперматозоидов.

Сперматозоиды рыб активируются при попадании во внешнюю среду, температура воды оказывает непосредственное влияние на характеристики подвижности спермы, такие как продолжительность и скорость движения сперматозоидов [Гинзбург, 1972; Alavi, Cosson, 2005]. Как известно, подвижность

сперматозоидов отражает их качество и оплодотворяющую способность [Cosson, 2019]. Поскольку энергетические ресурсы сперматозоидов рыб ограничены, увеличение скорости, вызванное повышением температуры в среде, приводит к более короткой продолжительности подвижности, и, наоборот, снижение температуры среды приводит к увеличению продолжительности подвижности и снижению их скорости. Для некоторых видов рыб высокая температура воды приводит к сокращению продолжительности подвижности сперматозоидов, но это сокращение компенсирует увеличение скорости их движения. Температура среды оказывает влияние на физиологию сперматозоидов, а именно на проницаемость мембран, ферментативную активность и энергетический метаболизм [Dadras, 2017].

Таким образом, температура активирующей среды, является важным физико-химическим фактором, влияющим на подвижность сперматозоидов [Dadras, 2017]. Изучение влияния температуры воды имеет решающее значение для улучшения методов искусственного размножения рыб при искусственных условиях.

Известно, что нерест черноморской камбалы калкан происходит при достаточно больших интервалах температуры верхнего слоя воды от 5,9° до 21,6 °С с марта по июль [Гордина, 1987; Овен, 2001]. Однако температура глубинной воды, где непосредственно происходит выброс спермы варьирует незначительно и составляет в среднем 8 °С [Белокопытов, 2017] в период нереста этого вида.

Методы определения качества спермы рыб.

В XX веке определение активности спермы рыб производили визуально под микроскопом, оценивая субъективно качество по типам движения спермиев в соответствии с различными шкалами [Персов, 1941; Таликина, 1975; Suquet, 1992], ориентировочно подсчитывали на глаз процент подвижных спермиев, например: 0 – все спермии неподвижны; 1 – от 1 % до 5–29 % подвижных; 2 – от 30 до 79 % подвижных; 3 – от 79 до 95 % подвижных; 4 – более 95 % подвижных сперматозоидов [Trippel, 2003], или для оценки подвижности спермы атлантического тюрбо [Suquet, 1992] использовали упрощенную схему оценки: 1 – от 0 до 25 %; 2 – от 50 % до 75 % и 3 – от 75 % до 100 % подвижных спермиев. Подобная оценка не позволяла провести статистический анализ данных.

Наиболее информативными методами определения жизнеспособности клеток спермы являются функциональные тесты, определяющие характеристики движения сперматозоидов: процент сперматозоидов, движущихся поступательно, скорость их движения и продолжительность активности до полной остановки [Копейка, 1983; Fauvel, 2010; Kime, 1996].

В последние два десятилетия широкое распространение получили методы компьютерного анализа определения качества спермы, значительно упрощающие получение и обработку количественных данных характеристик подвижности сперматозоидов [Kime, 2001; Rurangwa, 2004; Gallego, 2018]. Для определения характеристик движения сперматозоидов осуществляют видеозапись активированной спермы под микроскопом и анализируют полученные изображения с помощью специализированных компьютерных программ. Наиболее востребованной среди исследователей является программа ImageJ – программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений [Collins, 2007; Schneider, 2012]. Программа написана на языке Java сотрудниками National Institutes of Health и распространяется без лицензионных ограничений. Открытый интерфейс прикладного программирования позволяет расширять функциональность за счёт подключаемых плагинов, а встроенный макроязык – автоматизировать сложные повторяющиеся действия.

Большинство исследователей на данный момент используют, программу ImageJ с подключенным плагином **CASA** (computer assisted sperm analysis) [Suquet, Marc 2016; Wilson-Leedy, 2007; Gallego, 2018], и плагином **MTrack2** [Павлов, 2006, Емельянова, 2015].

Плагин MTrack2 разработан для вычисления скоростей движения любых объектов [Stuurman, 2003], плагин CASA – специально для определения характеристик активности сперматозоидов [Wilson-Leedy, 2007]. Плагины позволяют достоверно количественно и качественно определить характеристики движения спермы, рассчитывая реальную скорость перемещения отдельных клеток, а также характер изменения параметров во времени.

Однако, при использовании описанных плагинов алгоритм обработки видео файлов, внесение начальных данных в ImageJ, сохранение результатов анализа и их дальнейший перенос в статистические программы производится вручную для каждой пробы. Получение данных при анализе видеозаписей крайне трудоёмко и требует больших временных затрат.

1.2. Влияние биотических и абиотических факторов на эмбриогенез и развитие личинок камбалообразных

Пополнение популяций рыб жизнеспособной молодью напрямую зависит от эффективного продуцирования самками икры [Kjørsvik, 1990]. Низкое качество икры является одним из основных препятствий на пути развития аквакультуры как морских, так и многих пресноводных видов рыб.

Под качеством икры подразумевают способность овулировавших ооцитов к оплодотворению и последующему правильному эмбриональному развитию [Bobe, 2010]. Эндокринный статус самки во время гаметогенеза, ее физиологическое состояние, питание до и в течение репродуктивного цикла влияют на набор питательных веществ, содержащихся в икре. На показатели качества икры рыб также могут оказывать влияние генотип самки, фаза нерестового периода (начало, середина и конец нереста), процессы перезревания икры в гонадах [Kjørsvik, 1990; Bromage, 1994; Brooks, 1997].

Внешние условия среды, в которых происходит оплодотворение и дальнейший эмбриогенез оказывают влияние на успешное вылупление жизнеспособных личинок, а затем и на их переход на внешнее питание.

На качество икры влияют как экологические условия, в которых находятся естественные популяции, так и условия содержания производителей в условиях аквакультуры (качество воды, режим кормления, температурный режим, факторы, вызывающие стресс). [Lahnsteiner, 2000; Finn, 2007; Mylonas, 2010; Schreck, 2010; Villamizar, 2011]. Качество икры определяются внутренними свойствами икринок и

окружающей средой, в которой икра оплодотворяется и впоследствии инкубируется.

Характеристики, определяющие качество икры.

Простым показателем качества оплодотворенной пелагической икры морских рыб является плавучесть, однако икра с положительной плавучестью не всегда оказывается оплодотворенной, а у эвригаллиных видов оплодотворенная икра может быть, как пелагической, так и демерсальной в зависимости от солености воды. В свою очередь, оплодотворенная икра может обладать низким качеством и развиваться аномально [Павлов, 2008; Vobe, 2010].

Надежными показателями качества икры на начальных стадиях развития являются ее морфологические характеристики. Для ряда видов морских рыб установлена корреляция между качеством эмбриогенеза и выживаемостью личинок [Kjørsvik, 1990; Павлов, 2008; Vobe, 2010].

Размер икры не является надежным показателем ее качества, но низкая вариабельность размера икринок, полученной от одной самки, повышает вероятность нормального развития эмбрионов [Битюкова, 1998; Павлов, 2008].

По литературным данным, диаметр зрелых икринок калкана находится в пределах 1,17–1,26 мм, а диаметр жировой капли 0,19–0,21 мм [Битюкова, 1989].

Обнаружены положительные корреляции между качеством икры камбалы тюрбо, процентом выклева и жизнеспособностью личинок на стадии эндогенного питания (предличинки) в условиях стресс-тестов. Процент выклева личинок тюрбо из «низкокачественной» икры был существенно ниже процента выклева из икры «хорошего» качества. Качество икры определяло жизнеспособность и дальнейшее правильное развитие личинок и мальков тюрбо. Так, личинки, полученные из партий икры с высоким количеством аномальных бластомеров часто не завершали метаморфоз и имели аномальную пигментацию [Kjørsvik, 2003].

Влияние физиологического состояния самок на качество икры.

Физиология производителей и их гормональный статус определяют качество икры. Генетический материал и питательные вещества, необходимые для успешного развития, икра получает в процессе оогенеза. Знание механизмов, ле-

жащих в основе процессов созревания ооцитов, и того, как эти процессы координируются, необходимо для полного понимания факторов, влияющих на качество и оплодотворение икры [Brooks, 1997].

Ранее были проведены исследования оогенеза и полового цикла [Таликина, 1974; Воробьева, 1975, 1976] и особенностей формирования и реализации плодовитости черноморского калкана в море [Гирагосов, 2020]; детально описаны изменения морфологических особенностей черноморского калкана в течение эмбрионального развития [Ханайченко, Гирагосов, 2019]. Было изучено влияние температуры содержания самок в искусственных условиях на репродуктивные способности самок калкана [Туркулова, 2012].

Нерестовый сезон черноморского калкана на юго-западном шельфе Крымского полуострова начинается с апреля и длится до середины июня (чаще до конца I декады), а наиболее интенсивный нерест приходится на первые две декады мая [Ханайченко, Гирагосов, 2021]. Калкану свойствен прерывистый тип оогенеза и в процессе нереста расходный фонд не пополняется ооцитами из резервного фонда. Каждая самка вымётывает в среднем семь-восемь порций икры в течение нерестового сезона [Гирагосов, 2020].

Неполовозрелые и половозрелые самки в межнерестовый период имеют гонады II стадии зрелости: яичники содержат ооциты разных фаз периода превителлогенеза. Метаболизм самок черноморского калкана при подготовке к нересту изменяется в соответствии с потребностями растущих гамет. Физиологическое состояние самок зависит от абиотических и биотических факторов. Основные параметры физиологического состояния самок определяют по содержанию компонентов их крови, а именно: по общему белку, холестерину и липидам. В составе сывороточных белков преобладают альбумины, белок вителлогенин играет ключевую роль в развитии гонад самок, транспортируя в генеративную ткань биологически активные вещества и формируя вещество желтка икринки [Tagawa, 2001].

С началом интенсивного питания, которое приходится на холодное время года (конец ноября – начало декабря), создаются оптимальные условия для роста и развития гонад (из II стадии зрелости переходят в III). У части ооцитов начина-

ется асинхронный рост и происходит первоначальное накопления желтка. На III стадии зрелости яичников диаметр ооцитов увеличивается. В конце зимы до середины весны происходит интенсивное накопления желтка, формируется фонда ооцитов, реализуемых в нерестовый сезон текущего года. Группа вителлогенных ооцитов разной степени развития отделяется от превителлогенных ооцитов, составляющих резервный фонд, предназначенный для последующих нерестовых сезонов.

Для черноморского калкана было показано, что в течение нереста происходит общее снижение средних значений длины и массы тела производителей, нерест начинают раньше более крупные и старшие особи, мелкие и молодые особи нерестятся позже [Басова, 2000; Бойко, 2019]. Отмечена положительная корреляция потенциальной плодовитости с размером и возрастом самок. Однако более крупные самки калкана имеют меньшие запасы липидов в икре, что возможно свидетельствует об истощения ресурсов их печени и в дальнейшем может негативно отразиться на выживаемости потомства [Басова, 2000; Бойко, 2019].

Потенциальная плодовитость формируется к началу нереста и снижается по мере вымета порций икры [Гирагосов, 2020].

В период созревания ооцитов у калкана наблюдается изменение массы печени, которая является основным биосинтезирующим и депонирующим органом [Басова, 2000]. Развитие ооцитов происходит за счет основных строительных материалов – белков и липидов, которые синтезируются гепатоцитами. Высокое содержание нуклеиновых кислот и белков в преднерестовый сезон свидетельствует об уровне метаболической активности гепатоцитов у камбаловых рыб. В процессе созревания гонад происходит повышение общего холестерина крови, от которого зависит выработка половых гормонов и формирование мембран половых клеток. Липиды, вместе с гликогеном и белками, являются важнейшим энергетическим материалом камбаловых, и их содержание в печени варьирует в зависимости от сезона и физиологических особенностей рыб. Синтез и накопления белка в печени и половых железах калкана происходит одновременно. В процессе созревания количество липидов в гонадах самок увеличивается на 90 %. Благодаря высокому

содержанию в икре липидов, которые необходимы для формирования эмбриональных тканей зародыша, и жировой капли поддерживается её плавучесть [Басова, 2000; Бойко, 2019].

Белки, содержащиеся в овариальной жидкости, влияют на постовуляторное «старение», на допустимое время хранения икры, на её способность к оплодотворению, т.е. оказывают непосредственное влияние на её качество [Lahnsteiner, 2002].

Таким образом, физиологическое состояние самок, которое зависит как от predetermined генетических данных, так и от условий среды, в которых они находятся в период созревания гонад, определяют будущее «качество» икры калкана.

Влияние родительского «фактора» на характеристики камбалы калкана на этапах раннего онтогенеза.

Для оценки репродуктивного потенциала рыб необходимо понимание влияния родительского вклада производителей (как генетического, так и негенетического) на ранний период жизни их потомства, проявляющегося в его выживаемости и приспособленности. Сразу после оплодотворения родительский фактор влияет на онтогенез, физиологию, морфологию и выживаемость личинок. Уровень естественной смертности наиболее высок на ранних этапах онтогенеза и отрицательно коррелирует со скоростью роста и размером тела морских рыб. На ранних этапах онтогенеза (икра, личинки) даже незначительное увеличение смертности может негативно сказаться на успехе воспроизводства нового поколения рыб. Поэтому особенно важно понимать факторы, которые способствуют изменчивости смертности в раннем возрасте [Kroll, 2013].

Успех воспроизводства популяции рыб, как диких, так и выращенных в условиях марикультурных хозяйств, зависит от исходного качества гамет, обеспечивающего развития жизнеспособного потомства [Brooks, 1997]. Материнский вклад в потомство является продуктом как ядерно-генетического, так и внеядерного, негенетического материала, например: обеспеченность икры желтком [Rideout, 2005]. Материнский «фактор», а именно возраст, размер, физиологиче-

ское состояние самок, оказывает значительное влияние на качество икры (например: размер, содержание желтка, качество желтка, которое определяется составом липидов и определенных жирных кислот) [Chambers, 1996; Rideout, 2005; Kroll, 2013]. Было показано, что у некоторых видов рыб качество икры оказывает влияние на рост и выживание потомства на эмбриональной и личиночной стадиях развития [Rideout, 2005]. Считается, что отцовский вклад в характеристики потомства незначителен, так как он ограничивается исключительно продуктом ядерно-генетического материала (сперматозоидов). Существует ограниченное количество исследований, показывающих, что отцовские генетические эффекты влияют на морфологию и выживаемость потомства в течение раннего онтогенеза рыб [Ottesen, 2007; Kroll, 2013; Siddique, 2017; Benini, 2018].

Оценка воспроизводства популяций калкана по репродуктивным характеристикам самок и по характеристикам гонад самцов является недостаточной. Для приближенной к реальности оценки эффективности нереста популяции необходимо проводить мониторинг выживаемости потомства от оплодотворения до перехода на внешнее питание.

В отечественных и зарубежных работах по изучению характеристик развития икры и личинок морских рыб длительное время использовалась полиспермия (т.е. оплодотворение икры от одной самки спермой нескольких самцов). Но при использовании этого метода можно ожидать непредвиденного разброса данных. Кроме того, невозможно сравнение характеристик потомства от разных самок из-за потенциального отцовского влияния и взаимодействия отцовского и материнского генома на фенотипические характеристики потомства. При исследовании как «отцовского», так и «материнского» эффекта необходимо производить отдельные скрещивания гамет от отдельных самцов и самок, избегая использования смешивания спермы от различных самцов при оплодотворении. Влияние самцов производителей на процент нормальных личинок на выклеве изучается редко. Полностью отсутствуют данные по влиянию «отцовского» эффекта на характеристики и выживаемость калкана на ранних стадиях онтогенеза.

Качество икры в течение нерестового сезона.

Известно, что показатели жизнеспособности выметанной неоплодотворенной икры калкана варьируют на протяжении всего периода нереста этого вида. Так в работе [Jia, 2015] было установлено, что в середине сезона нереста диаметр неоплодотворенной икринки атлантического тюрбо *S. maximus* был значительно меньше, чем в начале и конце сезона. Для черноморского калкана установлено, что в сцеженных порциях икры диаметр зрелых икринок и жировых капель уменьшается в течение нерестового сезона, составляя в апреле, соответственно 1250 ± 50 и 215 ± 9 мкм, в мае – 1220 ± 70 и 212 ± 11 , а в июне – 1200 ± 50 и 196 ± 10 мкм [Гирагосов, 2020].

На качество икры, а именно на ее способность к оплодотворению, существенно влияет биохимический состав овариальной жидкости, который так же меняется в течение сезона нереста. Овариальная жидкость в середине сезона имеет низкое содержание белков, кислотной фосфатазы (является катализатором катаболизма фосфолипидов и деградации белка) и аспартатаминотрансферазы (внутриклеточный фермент, индикатор целостности клетки или ее повреждения), но высокие уровни рН и щелочной фосфатазы. Неорганические компоненты овариальной жидкости обеспечивают стабильную среду для сохранения икры и продление периода оплодотворения во время нереста. У многих видов морских рыб катионы (Na^+ , K^+ и Ca^{2+}) в составе овариальной жидкости влияют на подвижность сперматозоидов и способность к оплодотворению во время сезона нереста [Коуа, 1993; Lahnsteiner, 2007; Rosengrave, 2009]. Показано, что содержание белков и других органических веществ в овариальной жидкости атлантического тюрбо варьирует в течение сезона нереста. Так зарегистрированы изменения содержания неорганических ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^-) в овариальной жидкости *S. maximus* в течение нереста. В начале сезона нереста концентрация ионов в овариальной жидкости самок тюрбо составляла Na^+ 203,3 в середине 206,7, в конце 213,7, K^+ 9,6, 10,7 и 12,8, Cl^- 153,3; 165,3 и 172,7; Ca^{2+} 2,6; 2,7 и 2,5; рН 7,7, 8 и 7,5 [Jia, 2015].

Наибольший процент оплодотворения икры *S. maximus* зарегистрирован в середине сезона нереста, что скорее всего связано с высоким уровнем щелочной

фосфатазы и низким уровнем кислой фосфатазы и аспаратаминотрансферазы. В начале и конце сезона нереста существенных различий в проценте оплодотворения не установлено [Jia, 2015; Zadmajid, 2019].

Таким образом, биохимический состав овариальной жидкости, влияющий на микросреду, в которой происходит оплодотворение, а как следствие на способность икры быть оплодотворенной, т. е. на ее качество, адаптирован к оптимальным условиям, в которых происходит нерест.

Остаются неизученными особенности изменения качества икры камбалы калкана и дальнейшее эмбриональное развитие в течение нерестового сезона.

Влияние температуры на завершающие этапы оогенеза у самок черноморского калкана.

Репродуктивный потенциал самок рыб меняется в зависимости от температуры окружающей среды. Так в работе В. Н. Туркуловой [2012] показано, что самки с гонадами, находящимися на IV – V стадии зрелости при температуре воды 10 – 13° С созревают в два раза медленнее, чем при температуре 14 – 17 °С, но при низких температурах от самок было получено большее количество порций икры. Доля оплодотворенной икры варьирует в пределах – от 15 до 90 %, и наибольший процент оплодотворений регистрируют в первых 2–3 порциях. При повышенных температурах количество порций, число икринок в них и процент оплодотворения снижается. В среднем оплодотворяемость икры составляла: в первой – 42 % в последующих порциях – 35 %. Самки, имеющие гонады на IV – V стадии зрелости, при выдерживании при температуре воды 10 – 13 °С продуцировали икру в течение 8 – 15 суток, а при содержании при температуре 14 – 17 °С – не более 6 суток.

В. Н. Туркулова делает вывод, что для созревающих самок калкана, обитающих в северо-западной части Черного моря, наиболее оптимальной температурой является 10 – 13 °С. При увеличении температуры на 4 – 7 °С резко возрастает число рыб с резорбцией и ухудшается качество овулировавшей икры [Туркулова, 2012].

Эмбриогенез камбалы калкана.

Качество икры и её правильное развитие оказывает критическое влияние на жизнеспособность личинок и молоди морских рыб [Ware, 1975; Nissling, 1998; Avery, 2009]. Известно, что эмбриогенез – процесс, требующий больших энергетических затрат, и он в значительной степени зависит от ферментативных систем, обеспечивающих правильный метаболизма веществ, а следовательно и правильное развитие эмбриона [Tong, 2013].

От нормы морфологических характеристик зародышей в процессе их развития зависит выживаемость и физиологическое состояние будущих личинок. Развивающаяся икра после оплодотворения расходует только те вещества, которые были получены ооцитом в процессе оогенеза в яичниках самки. От правильного соотношения энергетических субстратов, а именно белков, липидов и углеводов, зависит успешный морфогенез икры. Углеводный обмен играет ведущую роль на ранних этапах эмбрионального развития камбалы тюрбо, в то время как липидный и белковый на стадиях от формирования бластулы до открытия рта у личинки. Изменение содержания белков, углеводов и липидов является ключевыми фактором, влияющим на активность пищеварительных ферментов, которые ответственны за гидролиз желтка [Tong, 2017].

Желток является единственным источником незаменимых питательных веществ, обеспечивающих все метаболические процессы в течение эмбрионального периода. Формирование мембран делящихся клеток, тканей и органов зародыша зависит от содержания фосфолипидов, находящихся в желтке. В процессе развития эмбриона тюрбо успешная экспрессия генов происходит при определенном содержании и соотношении незаменимых ненасыщенных жирных кислот в желтке [Cunha, 2015].

Для некоторых видов рыб известно [Lanes, 2012; Samae, 2010], что от содержания аминокислот, которые являются осмотически-активными соединениями, зависит плавучесть их икры. Показано, что жизнеспособные икринки имеют более высокий уровень аминокислот, чем нежизнеспособные.

Успешное развитие зародыша тюрбо в период органогенеза происходит при эффективном переносе липидных молекул между тканями и клеточными компонентами. Липиды необходимы для построения мембранных структур быстро делящихся клеток и производства энергии в процессе метаболизма и движения зародыша [Cunha, 2015].

Жировая капля, на долю которой приходится 55–60 % от общих липидов, содержащихся в икре, находится в неизменной форме в течение всего эмбрионального периода и начинает расходоваться только после выклева личинки [Ханайченко, 2017].

Этапы эмбриогенеза камбалы калкана.

Визуальная оценка потенциальной жизнеспособности эмбрионов камбалы калкана возможна по морфологическим признакам характерным для каждого этапа развития (Рисунок 2, Рисунок 4).

Этапы эмбриогенеза для отловленных в море икринок калкана впервые описаны Т. В. Дехник [1973] (Рисунок 4), которая выделяла шесть этапов: I – дробление (от оплодотворения до образования бластулы); II – бластуляция, заканчивающаяся образованием эпителиальной бластулы; III – гастрюляция (до образования бластопора); IV – органогенез (образуются слуховые капсулы и зачатки сердца, развивается пигментация до появления хвостовой почки); V – рост хвостового отдела (до начала пульсации сердца); VI – подвижный эмбрион (до вылупления).

В настоящей работе при оценке качества икры черноморского калкана мы использовали подробное описание эмбриогенеза, приведенное в работе [Ханайченко, Гиригосов, 2019].

В работе отмечено, что нормальный эмбриогенез калкана при температурах +14 – +16 °C длится от 114 ч до 94 ч соответственно.

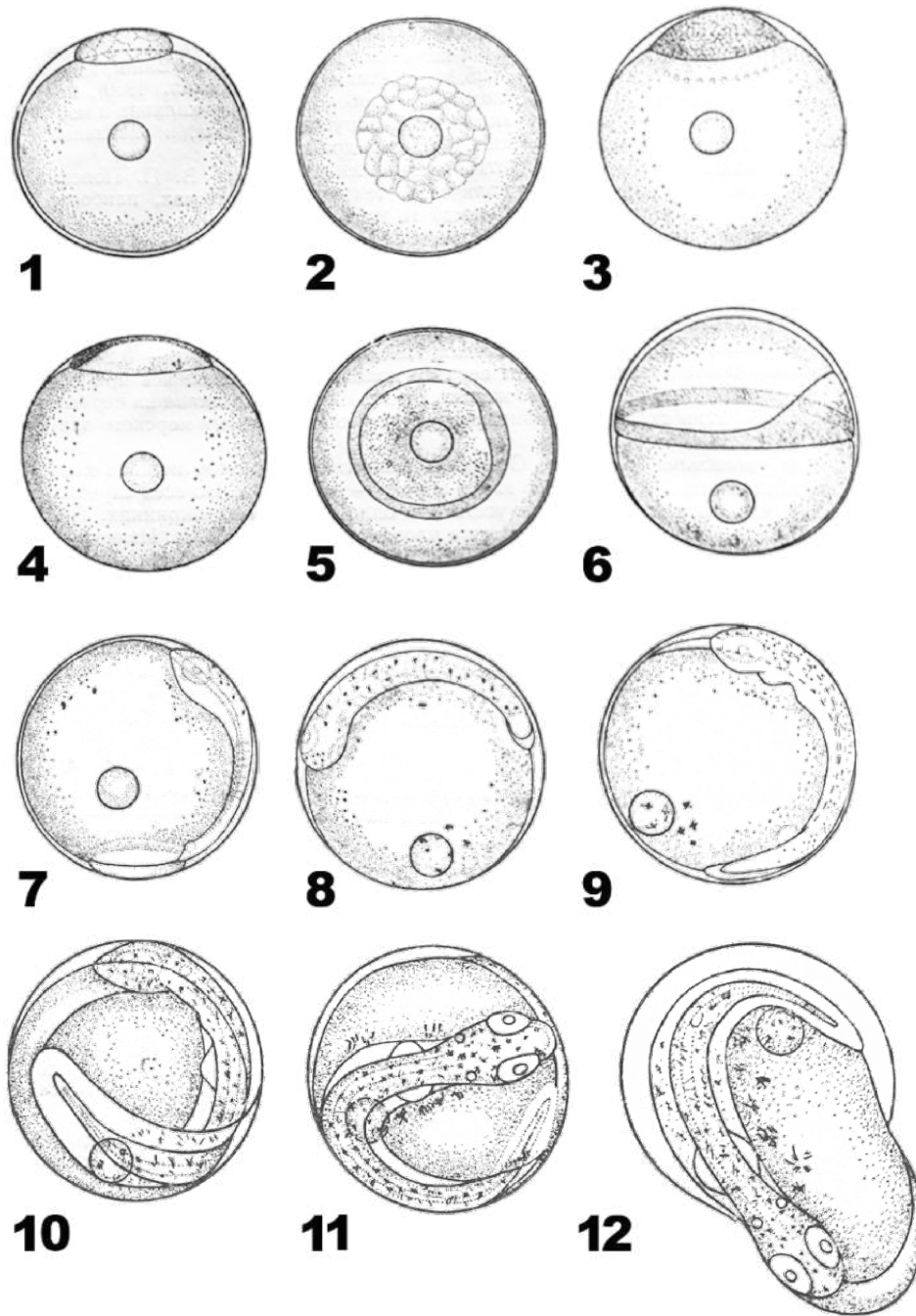


Рисунок 4 – Эмбриональное развитие камбалы калкана [рисунок из Дехник Т. В., 1973]: 1–2) этап I дробление, 2–3) этап II бластуляция, 5–7) этап III гастрюляция; 8) этап IV – органогенез; 9) этап V – рост хвостового отдела; 10–11) этап VI – подвижный эмбрион: 12) вылупление личинки.

Авторы выделяют следующие этапы эмбриогенеза:

I этап. Подготовка икринки к дроблению. Диаметр оплодотворённой икры варьирует от (1260 ± 140) до (1310 ± 150) мкм (диаметр жировой капли – 210–220

мкм). После проникновения сперматозоида, образуется дископодобная выпуклость – бластодиск. Завершается второе деление мейоза; формируется зигота, которая лежит на поверхности желточной массы, в центре которой находится одна жировая капля. Икра распределяется в верхнем слое воды.

II этап. Дробление цитоплазматического диска икры начинается с первого митотического цикла – образуются два одинаковых бластомера.

Далее происходит второе деление, с образованием четырехдинаковых бластомеров. После 4-го деления происходит дифференциация эмбриональных клеток эмбриона калкана. В конце 5-го митотического цикла, в результате деления формируются 32, отличающиеся по форме и размеру, бластомера, образуется крупноклеточная морула.

После 8-го митотического цикла в зародыше калкана насчитывается около 256 клеток.

III этап. Стадия бластуляции. Для нее характерны асинхронные деления клеток, ее условно можно разделить на раннюю, среднюю и позднюю бластулу и образование эпителиальной бластулы. Образуется желточный синцитиальный слой, называемый также перибластом. Он контролирует эпиболию, морфогенез и метаболизм эмбриона.

IV этап. В начале гастрюляции в процессе эпиболии желтка желточный цитоплазматический слой замещается перибластом. Формируется плотный сектор – утолщение из мигрировавших в результате центробежного движения клеток гипобласта, называемое зародышевым кольцом. В процессе гастрюляции происходит образование зародышевого щитка. Почти одновременно с гастрюляцией, в результате центробежной миграции внутренней массы бластомеров начинается закладка осевых зачатков.

V этап. Органогенез – определяющий период развития эмбриона калкана в течение которого продолжается эпиблия бластодермой желточной сферы (вплоть до полного обрастания желтка и формирования хвостовой почки) и одновременно формируется осевой комплекс первичных зачатков.

В начале сегментации между желтком и каудальной частью эмбриона калкана появляется сперва еле заметный зачаток временной структуры Купферова пузырька. Со времени завершения эпиболии желток, окружённый перибластом и клеточным материалом, называется желточным мешком и является неотделимой частью эмбриона калкана, так как выполняет множество функций, в том числе трофическую. Формируется хвостовая почка зачатка хвостового отдела эмбриона калкана, в которой формируется участок ното хорды, от которого происходит дальнейший рост хвостового отдела.

Из мигрирующих клеток нервного гребня начинают дифференцироваться хроматофоры, на туловище эмбриона калкана появляются точечные меланофоры. Начинают формироваться свободные лопасти парных грудных плавников. Глазные бокалы, соприкасаясь с эктодермой головы эмбриона, начинают преобразовываться в двуслойную глазную чашу. Растущий хвостовой отдел отделяется от границы желточной сферы, в нём дифференцируются хорда и спинной мозг, продолжают дальнейшую сегментацию и образование сомитов.

VI этап. Начало нейромышечной моторики эмбриона калкана. Хвост эмбриона охватывает более 60 % поверхности желточного мешка. Дифференцируются ксантофоры, придающие телу эмбриона розоватый оттенок. На спинной стороне тела в дерме калкана наряду с меланофорами присутствуют ксантофоры. На внутренней поверхности оболочки эмбриона из эпибласта дифференцируются хлорид-секретирующие клетки.

VII этап. Подготовка к вылуплению. Хвост зародыша калкана охватывает большую часть желточного мешка, практически соединяется с головой и почти полностью отсоединяется от желточного мешка. Эмбрион свободно вращается внутри оболочки икринки. Моторика эмбриона способствует диффузии кислорода и ионов в перивителлиновой жидкости. Под действием ферментов вылупления оболочка икринки становится эластичной, и во время энергичных вращений зародыша она постепенно растягивается. Активные резкие движения эмбриона приводят к растягиванию, утончению и разрыву оболочки, а также к выходу из неё эмбриона головой вперёд.

Эмбриогенез при повышении температуры инкубации икры с +14 до +16 °С сокращается с 114 до 94 ч. В партии правильно развивающейся качественной икры выклев происходит синхронно – в течение 1–2 ч, в то время как в партиях икры с разнородным физиологическим и генетическим материалом и при низких температурах выклев может растянуться на 6–8 ч [Ханайченко, Гиригосов 2019].

Постэмбриональное развитие калкана.

После выклева предличинки калкана билатерально-симметричны; глаза не пигментированы; реакция на свет отсутствует. Стандартная длина тела (SL) находится в пределах от (2530 ± 130) до (2910 ± 100) мкм в зависимости от наследственности и температурных условий, при которых проходил эмбриогенез. Большой овальный желточный мешок, занимающий до 50 % длины тела, и жировая капля диаметром 210–220 мкм, расположенная в задней трети желточного мешка, создают положительную плавучесть, удерживая малоподвижных предличинок в подповерхностном слое воды (брюшной стороной наверх) [Ханайченко, Гиригосов, 2019].

Выклюнувшиеся личинки концентрируются у самой поверхности, длительное время (в течение нескольких минут) они находятся в покое в горизонтальном положении (брюшной стороной кверху). Периоды покоя сменяются короткими перемещениями, при этом личинки не меняют положения в воде. Движения осуществляются при помощи волнообразных изгибов хвостового отдела.

В течение суток длина личинок достигает в среднем 3500 мкм. Значительно увеличивается хвостовой отдел относительно общей длины тела. Желточный мешок приобретает сферическую форму и при этом резко уменьшается в размере. Голова освобождается от желтка, намечается ротовая ямка. Пигментация тела усиливается. В туловищном отделе наряду с розовым пигментом появляется коричневый. Личинки по-прежнему держатся у поверхности и плавают в перевернутом горизонтальном положении.

В возрасте двух суток начинается пигментация глаз. Личинки перемещаются в воде, наклоняя тело вниз головой, и распределяются в толще воды у поверхности. Периоды покоя составляют до 1 мин – 30–40 сек.

У трехсуточных личинок сохраняется желток и жировая капля. Глаза интенсивно пигментируются. Прорезается рот. Грудные плавники значительно увеличиваются и приобретают подвижность. Личинки становятся очень активными. При движении личинки принимают нормальное горизонтальное положение — спиной кверху.

У пятисуточных личинок еще имеется небольшой остаток желтка и маленькая жировая капля. Формируются челюсти, рот приобретает подвижность. Кишечник заметно утолщается. Личинки интенсивно окрашены черным, коричневым и розовым пигментом. Они по-прежнему держатся в основном в приповерхностном слое. При помощи грудных плавников и волнообразных изгибов тела личинки быстро плавают в разных направлениях.

На седьмые сутки сохраняется незначительный желточный мешок и маленькая жировая капля. Челюсти оформлены. Большие веерообразные грудные плавники находятся в непрерывном движении [Дехник, 1973].

Влияние абиотических факторов на выживаемость и развитие эмбрионов и личинок калкана.

Наряду с биотическими факторами существенное влияние на развитие эмбрионов и личинок рыб оказывают условия среды, в которых они развиваются. Влияние температуры и солёности воды на развитие и выживаемость эмбрионов и личинок калкана были подробно изучены сотрудниками ИнБЮМ, АЗНИИРХ и ВНИРО [Попова, 1975; Иванов, 1975; 1987, 1999; Битюкова, 1982, 1989, 1998; Маслова, 2013, Ханайченко, 2017, 2019]

Влияние температуры воды на развитие и выживаемость эмбрионов калкана.

Одним из важнейших абиотических факторов, оказывающим влияние на созревание пелагической икры рыб является температура воды. Нерест рыб наступает и осуществляется только при определенной температуре [Строганов, 1962]. Разгар нереста калкана, в зависимости от температуры воды в Черном море, приходится на апрель–май или конец мая–июнь. Наибольшую численность икринок в море отмечают при температуре воды от 11,5 °С до 15°С [Гордина, 1999].

После оплодотворения икра калкана поднимается с глубины 50–70 м до поверхности воды приблизительно за 2–2,5 ч (расчётные данные) и претерпевает значительный перепад температуры от 6–10 °С (в придонном слое воды) до 10 – 18 °С (в поверхностном слое воды). Икра калкана на начальном этапе развития должна быть эволюционно адаптирована к широкому диапазону температурных изменений. [Гордина, 1999; Битюкова, 1982; Ханайченко, 2017].

Экспериментально установлено, что у калкана, как и у ряда морских и пресноводных рыб, в процессе развития меняется термочувствительность эмбрионов [Битюкова, 1982, 1984]. Отклонения от оптимального температурного режима инкубации икры рыб могут оказывать повреждающее действие на эмбрионы и увеличивать их смертность.

Данные полученные [Гордина, 1999; Битюкова, 1982] свидетельствуют о высокой чувствительности эмбрионов калкана к низким и пониженным (7–10°С) температурам. В этом диапазоне температур развитие эмбрионов резко замедляется. Длительность эмбрионального периода при 10 °С составляет 220 ч, а при 16 °С – 84 ч.

Толерантность к пониженным температурам в начале эмбриогенеза выше, чем на этапах завершения гастрюляции и вылупления. Развитие эмбрионов калкана на I – II этапах происходит в широком диапазоне температур, от 7 до 15 °С [Битюкова, 1982, 1984].

В период эмбрионального развития нижние критические температуры сдвигаются от 3°С на I – II этапах, до 7 °С на V – VI этапах, соответственно сублетальные температуры составляют 7 °С для III этапа и 10 °С для V – VI этапов. Инкубирование икры при температуре 7 °С вызывает появление зародышей с большими желточными пробками, а общее количество аномально развивающихся икринок достигает 50 %. В этот период развития возможны также скрытые нарушения, которые не выявляются при морфологическом исследовании эмбрионов и реализуются на более поздних этапах, вызывая гибель эмбрионов до их вылупления. При температуре 10 °С значительно снижается количество аномальных эмбрионов в момент завершения гастрюляции. Далее развитие продолжается без

видимых аномалий, однако резко замедляется на V – VI этапах. Задержка вылупления сопровождается рядом патологических нарушений. Количество вылупившихся предличинок со значительными аномалиями (искривление хорды, оводнение полости желточного мешка, увеличение сердечной полости) достигает 73 %. Наиболее частые дефекты у предличинок в этот период – гипертрофированное сердце, водянка миокарда.

На этапе гастрюляции температура 7–10 °С вызывает значительные нарушения в развитии эмбрионов. Что, по-видимому, свидетельствует о том, что именно на этом этапе начинают происходить важные морфогенетические движения в зародыше и скорость этих процессов определяет норму развития эмбрионов [Ханайченко, 2017, 2019].

На более поздних этапах (V–VI) даже температура 9–10 °С значительно замедляет развитие и приводит к выклеву аномальных эмбрионов.

При низких температурах длительное развитие происходит на фоне малой подвижности эмбрионов, слабого перемешивания жидкости перивителлинового пространства, в результате чего нарушаются обменные процессы со средой. Накопленные метаболиты затрудняют дыхание эмбрионов, вызывают характерные нарушения кровообращения [Битюкова; 1982]. Отклонения от оптимальной для органогенеза температуры, может привести к нарушению метаболизма в период от начала сегментации до формирования хвостовой почки. При 11 °С выявлена достоверная связь между низким кислородным обменом на этапе сегментации, задержкой в развитии, нарушениями структуры Купферова пузырька, проявляющихся на более поздних этапах развития аномалиями хвостового отдела и, как следствие, низкой выживаемости личинок [Ханайченко, 2017, 2019].

Изучение комбинированного влияния температуры и солености на эмбриогенез и развитие ранних стадий личинок показало, что выклев более 50 % жизнеспособных предличинок происходит при температуре 15–17 °С и солености 15,7–18,3 ‰. Наибольшие размеры личинок и объем желточного мешка на выклеве наблюдали при температуре инкубации 15 °С и солености 18,3 ‰ [Климова, 1993].

От температуры воды так же зависит пространственное и вертикальное распределение икринок камбалы-калкана: чем выше температура воды верхнего слоя моря, тем над большими глубинами наблюдают максимальные концентрации икринок. Пик численности икринок над глубинами от 10 до 25 м регистрируют при температуре поверхности моря от 12 до 13 °С. С дальнейшим прогревом воды численность икринок снижается до единичных экземпляров. Над глубинами от 26 до 50 м, максимальное количество икринок наблюдают при температуре поверхностного слоя воды от 18,5 до 19,5 °С, а при температуре ниже 14,0 °С икринки встречаются единично. Над глубинами свыше 50 м на горизонтах 0,5 и 15 м икринки преобладают при температуре воды у поверхности от 14,0 до 14,5 °С, а на горизонте 10 м наибольшее количество икринок – при температуре воды поверхностного слоя 20,0 °С [Климова, 1993].

Таким образом, по-видимому, успешный нерест калкана происходит после прогрева поверхностных вод как минимум до 12 °С, но наиболее эффективный нерест этого вида приходится на период, когда температура поверхностных вод достигает 15–16 °С [Ханайченко, 2019].

Влияние температуры на развитие и выживаемость личинок калкана.

Температура воды оказывает наибольшее влияние не только на развитие эмбрионов, но и на дальнейшую выживаемость личинок калкана от этапа выклева до перехода на внешнее питание.

Считается, что диапазон оптимальных температур для развития личинок калкана на этапе эндогенного питания в Чёрном море составляет 15–22 °С [Битюкова, 1984]. Расход желтка в этом диапазоне не зависит от температуры. Максимальное количество жизнестойких личинок отмечено при комбинации температур 15 °С и 18 °С и солёности 17,2–18,6 ‰ [Битюкова, 1984].

Длительность развития личинок до выклева сокращается при увеличении температуры. Так, выклев личинок тюрбо при температуре 12 °С происходит через 6 дней, а при 16 °С через 3 дня на относительно ранней стадии развития [Gibson, 1995].

От температуры воды зависит не только длительность органогенеза на личиночных стадиях, но и последовательность развития некоторых органов. При 12°C в следующем порядке появляются сначала плавательный пузырь, затем открывается анальное отверстие (к моменту истощения желтка), и дифференцируется хвостовой плавник. При 16 °С хвостовой плавник появляется одновременно с появлением анального отверстия, а формирование позвонков в области ушной капсулы происходит после формирования плавательного пузыря и истощения желтка, что не наблюдается у личинок при 12 °С [Gibson, 1995].

Влияние солености воды на развитие и выживаемость эмбрионов и личинок черноморского калкана.

Как и температура, соленость является важным абиотическим фактором, лимитирующим выживание пелагической икры морских рыб и ее развитие [Битюкова, 1998; Nissling, 2006]. Камбала калкан в Черном море находится в условиях солености воды около 17–18 ‰, в Азовском море в условиях пониженной, по сравнению с Черным морем солености от 11 до 18 ‰. Близкородственный вид Атлантический тюрбо (*Scophthalmus maximus* L.) обитает в водах соленостью от 5 ‰ – в Балтийском море, до 35 ‰ – в восточной части Атлантического океана.

Солёность воды может определять размер и плавучесть икры рыб одного вида. Так в отличие от камбал, обитающих в Северном море (32–35 ‰) море, имеющих крупную пелагическую икру, камбалы Балтийского моря (соленость от 2 до 11 ‰) адаптировались к условиям солоноватой воды, производя более мелкую демерсальную икру [Nissling, 2006].

Влияние солёности на развитие и выживаемость черноморской камбалы калкана хорошо изучено Битюковой [1998] и Ткаченко [1998]. Нерест калкана на черноморском шельфе Крыма происходит на глубине 50–95 м на незначительном удалении от берегов [Гирагосов, 2020], где солёность претерпевает существенные межгодовые и сезонные колебания от 13 до 21,5 ‰ [Дехник, 1976, Зайцев, 1959].

Икра камбалы *Scophthalmus torosus*, обитающей в Азовском море, способна к оплодотворению в широком диапазоне солёности от 10 до 30 ‰ [Дехник, 1976, Надолинский, 2018]. По данным полученным в работе Битюковой [1998] при 9 ‰

для икры происходит оплодотворение лишь единичных икринок как «черноморской», так и «азовской» камбал, а при 13‰ оплодотворяемость не превышает 30–42 %; наибольшее количество оплодотворённой икры на стадии дробления наблюдали при 16–20 ‰, а при солёности выше 20 ‰ оплодотворяемость икры снижалась на 20–25 % по сравнению с процентом оплодотворения при оптимальной солёности [Булли, 2015].

При солёности более 16 ‰ икра черноморской камбалы распределяется в приповерхностном слое, где происходит ее нормальное развитие.

Максимальный выклев нормально развивающихся эмбрионов черноморского калкана наблюдали при 17–18 ‰. При солёности соответствующей нейтральной плавучести (15,7 ‰), эмбриогенез на первых двух этапах протекает без видимых отклонений, но на этапе гаструляции увеличивается смертность. В результате нарушений процесса органогенеза смертность остается высокой, и на последующих этапах – от 10 до 15 % выклевывающихся эмбрионов оказываются нежизнеспособными. При 22–26 ‰ снижается количество выклюнувшихся личинок и увеличивается доля аномальных особей.

Эмбрионы азовского калкана, содержащиеся при солёности 40 ‰, продолжают развитие, но практически все погибают на этапе органогенеза, с нарушениями формирования хвостового отдела туловища, к моменту выклева выживает менее 1 % икринок. При 30 ‰, происходит выклев около 20 % личинок, однако, 90 % из них успешно переходит к внешнему питанию. Интересно, что солёность 30 ‰, которая является благоприятной для атлантического тюрбо, вызывает у большей части эмбрионов калкана нарушения в развитии [Булли, 2018].

Лучшие результаты инкубации икры и выращивания личинок, как черноморской камбалы, так и азовской, получены в воде солёностью 18–20 ‰.

Таким образом, икра и личинки черноморского и азовского калкана наилучшим образом адаптированы к естественным условиям, в которых происходит их развитие.

Влияние гидрологического режима на выживаемость личинок на выклеве.

Гидрологический режим, особенно, турбулентность, может оказывать существенное влияние на организмы, обитающие в толще воды, в том числе на развитие и выживаемость икры и личинок рыб в естественных и искусственных условиях. Высокие уровни турбулентности вызывают механическое разрушение оболочек икры и структур личинок, снижая их выживаемость. С другой стороны, турбулентность может действовать как механизм, с помощью которого организмы с положительной плавучестью равномерно распределяются в толще воды.

При выращивании рыб в искусственных условиях оптимальные уровни турбулентности воды различаются для разных видов рыб [Killgore, 1987; Gaignon, 1998; Li, 2018]. В условиях марикультурных хозяйств одним из важных факторов, влияющих на выживаемость и качество посадочного материала (личинок на выклеве), является интенсивность продувки воздухом (барботажа) в инкубаторах для икры.

Для черноморского калкана показано, что продувка воздухом (10–30 мл/мин), приводит к гибели нежизнеспособных эмбрионов на этапе вылупления [Маслова, 2013]. Данные о размерных характеристиках и выживаемости эмбрионов и личинок при различных уровнях барботажа для черноморского калкана отсутствуют.

В работе [Gaignon, 1998] было показано, что факторы, влияющие на гидродинамику в инкубаторах (поток воздуха и направление циркуляции воды) оказывают влияние на выживаемость личинок тюрбо в первые десять дней после вылупления. Наблюдаемые эффекты, зависят от стадии развития личинок. Увеличение протока воды и уменьшение продувки воздухом оказывают негативное влияние на выживаемость личинок, находящихся на этапе эндогенного питания.

Направление циркуляции воды является ключевым фактором, оказывающим влияние на смертность эмбрионов и личинок на всех этапах развития. Восходящие потоки воды в инкубаторах повышают выживаемость личинок, в то

время как изменение от восходящего к нисходящему направлению воды увеличивает их смертность.

Считается, что выживаемость личинок атлантического тюрбо, находящихся на этапе смешанного питания, в большей степени зависит от направления циркуляции воды, чем от методов кормления. Возможно это связано с тем, что плавучесть личинок до окончания периода смешанного питания зависит от размера их жировой капли, и в этот период происходит формирование плавательного пузыря, который становится функциональным на 3–4 сутки [Cousin, Baudin-Laurencin, 1985]. Наличие плавательного пузыря улучшает плавучесть личинок и благодаря этому снижает их энергозатраты на плавание и передвижение [Blaxter, 1986], а нисходящий поток воды может увеличить энергозатраты личинок на поддержание плавучести.

В работе [MacKenzie, 2000] было показано, что повышенная турбулентность повышает вероятность встречи с пищей личинок в начале экзогенного питания, которые имеют незначительную подвижность, по сравнению с более крупными личинками на более поздних стадиях развития.

Так, выживаемость личинок тюрбо (на третьи сутки после вылупления, на момент открытия рта) в морской воде (при солености 35 ‰) при скорости аэрации 30 мл мин⁻¹ оказывалась выше (47 %), чем при 10 мл мин⁻¹ (24 %) [Gaignon, 1998]. В работе Ли [Li, 2018] рассмотрено влияние скоростей искусственной аэрации в экспериментальных аквариумах на молодь тюрбо. Показано, что при скоростях аэрации равных 0,36 м/с молодь тюрбо подвергалась стрессу, который сопровождался снижением скорости роста, уменьшением потребления корма и снижением активности. Было обнаружено, что при скоростях 0,36 м/с значительно снижается содержание антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и глутатиона), которые часто используются в качестве биомаркеров окислительного стресса у рыб, и значительно увеличиваются концентрации общего билирубина и азота мочевины в плазме. Уменьшение скорости до 0,18 м/с приводило к увеличению потребления корма молоди, стимуляции её роста и значительно более высоким уровням активности щелочной фосфатазы и кислой фосфатазы в плазме крови,

которые являются маркерами усиления врожденного иммунитета. Чрезмерно высокие скорости барботажа являлись стрессором для тюрбо, вызывающим иммунный ответ в коже рыб, чувствительной к изменениям окружающей среды [Li, 2018].

Ранняя смертность личинок тюрбо в искусственных условиях, вероятно, зависит не только от качества икры, температуры и солёности воды, но и от гидродинамического режима в инкубаторах. Скорость и направление циркуляции воды (восходящий / нисходящий поток), являются важными факторами, влияющими на выживание личинок тюрбо.

Остается полностью не изученным вопрос о влиянии гидрологического режима на выживаемость эмбрионов и личинок черноморского калкана.

* * *

Из представленной выше информации следует, что эффективность воспроизводства калкана в естественных и искусственных условиях зависит от комбинированного воздействия переменных гидрологических (температура, солёность, гидродинамические условия) и биологических параметров (качество родительских гамет, зависящее от физиологического состояния производителей) на стадиях онтогенеза до перехода на внешнее питание. Физиологическое состояние производителей оказывает непосредственное влияние на качество половых продуктов и дальнейшее успешное эмбриональное развитие.

Характеристикой качества сперматозоидов является успешность оплодотворения (при условии качественных женских гамет). Вариабельность показателя оплодотворения положительно коррелирует со скоростью движения сперматозоидов. На способность к оплодотворению влияет продолжительность активности спермы после активации.

Надежным показателем качества икры являются ее правильное развитие, которое выражается в определенных морфологических характеристиках. Выживаемость калкана на ранних стадиях развития до перехода на внешнее питание определяется нормой развития эмбрионов и личинок. Для черноморского калкана

достаточно хорошо изучено влияние солёности и температуры воды на развитие на ранних этапах онтогенеза в искусственных условиях. Отклонения от оптимального температурного режима инкубации рыб могут оказывать повреждающее действие на эмбрионы и увеличивать их отход. Экспериментально установлено, что у калкана, в процессе развития меняется термочувствительность эмбрионов. Факторы, влияющие на гидродинамику в инкубаторах (поток воздуха и направление циркуляции воды) оказывают влияние на выживаемость личинок атлантического тюрбо и успешное развитие молоди.

Таким образом, вопросы влияния отдельных абиотических факторов среды на развитие камбалы калкан и родственного ей атлантического тюрбо на разных этапах онтогенеза в естественных и искусственных условиях представлены в исследованиях ряда ученых.

Тем не менее, остается неизученным ряд вопросов, а именно отсутствуют данные по характеристикам спермы камбалы калкана из естественных популяций Черного моря, динамики подвижности спермы в зависимости от времени после активации; изменение характеристик спермы в течение нерестового сезона, взаимосвязь между морфологическими характеристиками самцов и характеристиками их спермы в период нереста. До настоящего времени не проводилась оценка родительского («мужского» и «женского») влияния на характеристики камбалы калкан на этапах раннего онтогенеза. Остается открытым вопрос о влиянии температуры воды на развитие и выживаемость икры и личинок калкана, полученных в различные фазы нерестового сезона. Отсутствуют данные о влиянии гидродинамических условий на рост и выживаемость личинок черноморского калкана до начала экзогенного питания.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал исследования

Исследования проводили в течение 2007–2014 гг. на базе Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского.

С целью оценки состояния нерестовой популяции камбалы калкан 2007–2014 гг. исследовали размерно-возрастную и половую структуру, особенности репродуктивной биологии этого вида рыб по материалу собранному на юго-западном шельфе Крымского полуострова, в акватории с координатами 44°36'–44°41' с.ш., 33°19'–33°31' в.д. Рыбу получали из уловов камбальных сетей с размером ячеи 200 мм в период нерестовой миграции калкана в апреле-июне на глубинах 40–90 м при температуре поверхностного слоя воды 9–23 °С.

При проведении стандартного биологического анализа у рыб измеряли абсолютную (TL), стандартную (SL) длины и общую массу тела (Wt). При проведении полного биологического анализа по общепринятой методике (Правдин, 1966) измеряли массу тела без внутренностей (Ws), массу печени (W_L) и гонад (W_G), определяли пол и стадию зрелости. Гонадосоматический индекс (ГСИ) рассчитывали по формуле: $ГСИ = g \cdot 100 / W_s$, где ГСИ – гонадосоматический индекс, g – масса гонад в граммах, W_s – соматическая масса тела (масса тела без внутренностей) в граммах. Морфометрический анализ выполняли по схеме, предложенной М. Карапетковой [1980].

Объектом исследования являлись: камбала калкан, сперма, эмбрионы и личинки калкана, полученные от разных производителей из естественных популяций. Индивидуальные характеристики спермы были изучены по пробам 2007, 2008, 2010, 2012–2014 гг. полученным от 142-х самцов калкана из естественной популяции, произведена видеозапись 360 проб спермы. В каждой пробе прослежено движение от 2 тыс до 6 тыс сперматозоидов. В течение нерестовых сезонов 2007–2010 гг. был проведен мониторинг развития 18 партий

оплодотворенной икры и личинок калкана. Всего в ходе экспериментов прослежено развитие 35 тыс. эмбрионов.

2.2. Методы определения характеристик спермы камбалы калкана

У самцов калкана непосредственно после их извлечения из сетей производили отбор спермы в одноразовые стерильные шприцы (без иглы). Пробы немедленно помещали в термос над слоем льда (4–6 °С). Период между отбором проб и их доставкой в лабораторию составлял 2–4 часа.

Разбавление спермы от каждого самца проводили в трех повторностях. Каплю разбавленной спермы объемом 0,1 мл наносили на предметное стекло, так чтобы суспензия не растекалась по стеклу, а сперматозоиды не увлекались током жидкости. Предметное стекло с образцом спермы не накрывали покровным стеклом, что позволяло сперматозоидам свободно двигаться в суспензии.

С помощью инвертированного микроскопа NikonEclipse с подсоединенной аналоговой видеокамерой проводили запись свежего мазка спермы сразу после активации морской водой. Далее обрабатывали видеоролики в программе ImageJ. По полученным в ImageJ длинам пути каждого сперматозоида рассчитывали скорости движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL, мкм/с), процент подвижных сперматозоидов для каждого образца. Подробное описание компьютерного метода анализа характеристик движения сперматозоидов приведено в разделе 3. В соответствии с общепринятой системой оценки подвижности спермы рыб [Burness, 2005; Павлов, 2006] и собственными предварительными экспериментами, сперматозоиды со скоростью менее 20 мкм/с считали малоподвижными и не учитывали при подсчете средних скоростей.

Определение характеристик движения сперматозоидов.

В процессе записи видео перемещения сперматозоидов поле зрения меняли, выбирая участки с наиболее подвижными клетками. Многие активные сперматозоиды быстро уходят из поля зрения, в связи с этим их подвижность анализировали на протяжении коротких (0,5 с) отрезков времени. В программе VirtualDubMod

производили нарезку каждого видеоролика в 5 различных полях зрения по 15 кадров. Полученные ролики (5 для каждой повторности, т. е. 9 шт. для каждой пробы) сохраняли отдельными файлами с частотой 25 кадров в секунду не содержащими аудиодорожку. Обработано около 2 тыс видеороликов.

Определение концентрации спермы.

Концентрацию сперматозоидов в эякуляте (сп/мкл) подсчитывали в камере Горяева. Для этого сперму разбавляли морской водой в соотношении 1:100 в двух повторностях для каждой пробы. Заполненную камеру помещали под микроскоп и записывали видео с изменением глубины резкости. В полученных видеороликах с помощью программы VirtualDubMod вырезали видимую область с линейными параметрами равными площади большого квадрата камеры Горяева (0,2 мм²). Таким образом, один ролик содержал запись всех сперматозоидов в объеме жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки камеры. Для подсчета концентрации сперматозоидов в 1 мкл (сп/мкл) регистрировали 5 таких квадратов для каждой пробы. Видео анализировали с помощью плагина wrMTrack Batch в программе ImageJ.

Проведение исследований характеристик спермы калкана в зависимости от степени разбавления морской водой.

Индивидуальные характеристики сперматозоидов были изучены на образцах, полученных от самцов камбалы из естественной популяции.

Для изучения характеристик подвижности сперматозоидов 0,1 мл спермы разводили морской водой в соотношении 1:10 и 1:100.

В эксперименте видеосъемку движения сперматозоидов проводили в свежих мазках спермы в трех повторностях (разведение проводилось в отдельных емкостях для каждой повторности), взятых из планшета как сразу после разведения, так и через 5, 10, 15, 20 мин.

Длительность подвижности спермы калкана после ее активации морской водой.

Для исследования продолжительности активности и изменения характеристик спермы калкана со временем после активации производили разбавление 0,1

мл спермы 1:10 морской водой $t = 16^{\circ}\text{C}$. В течение эксперимента разбавленная сперма находилась в планшете при комнатной температуре $t = 25^{\circ}\text{C}$. Производили записи подвижности сперматозоидов в свежем мазке спермы, отобранном из планшета через 10, 30 и 60 мин. Для трех проб спермы запись подвижности осуществили через 10, 30 и 60 мин. и 7 часов после активации морской водой.

Установление наличия связей между размерно-возрастными и биологическими характеристиками самцов и характеристиками спермы калкана.

По данным полученным в 2007, 2008, 2010 и 2012–2014 гг. для установления наличия связей между размерно-возрастными и физиологическими характеристиками самцов и свойствами спермы были рассчитаны значения корреляций между такими характеристиками как: скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции, процент подвижных сперматозоидов, концентрация сперматозоидов, стандартная длина самца, соматический вес, вес печени и гонад.

При расчетах зависимостей использованы данные по объему спермы и биоанализу калкана, полученные сотрудниками отдела аквакультуры и морской фармакологии ФГБУН ИнБЮМ к.б.н., с.н.с. Гиригосовым В. Е. и вед. инженером Ельниковым Д. В.

Определение вариабельности характеристик спермы камбалы калкана в зависимости от фазы нерестового периода.

Анализ характеристик спермы камбалы калкан проводили на протяжении нерестовых сезонов 2007, 2008 и 2010 гг. Нерестовый период был условно разделен на фазы:

апрель – первые числа мая – начало сезона;

середина – конец мая – середина сезона;

июнь – конец сезона.

Значения характеристик спермы оценивали при разбавлении 1:10 морской водой сразу после их активации.

2.3. Методика проведения экспериментов по развитию эмбрионов и личинок калкана

Материалом для исследования особенностей эмбриогенеза черноморского калкана послужила искусственно оплодотворённая икра, полученная от производителей калкана, из естественных популяций. Экспериментальные работы по оплодотворению и инкубированию икры проводили в 2007–2010 гг. в период естественного нереста калкана – в апреле–мае. Половые продукты сцеживали у текущих производителей как непосредственно на судне сразу после выборки сетей, так и в лабораторных условиях при содержании рыб в пластиковых бассейнах (при температуре воды 12–13 °С).

Оплодотворение проводили «сухим» способом Врасского: к свежесцеженной икре добавляли неразбавленную сперму (объемное соотношение спермы и икры около 9 000 сперматозоида на икринку), аккуратно перемешивали с помощью птичьего пера, затем через 2–4 минуты добавляли 1/2 объема морской воды и перемешивали повторно.

Инкубацию всех вариантов оплодотворений икры проводили в идентичных объёмах и исходном равном количестве, в одинаковых условиях кислородного режима, освещения и скорости подмены воды. Вода для инкубации, полученная из бухты Мартыновой (г. Севастополь), проходила грубую очистку, отстаивание, ультрафильтрацию через последовательные картриджные фильтры 10, 5 и 1 мкм, и дополнительную обработку ультрафиолетом.

Морфологические измерения икры выполнены по двум признакам: диаметр икры (D), мкм, диаметр жировой капли (OD), мкм; личинок по трем: стандартная длина личинки (SL), мкм, объем желточного мешка (VYS) мкм³ (объем рассчитывали по его высоте и длине) диаметр жировой капли(OD), мкм (Рисунок 5).

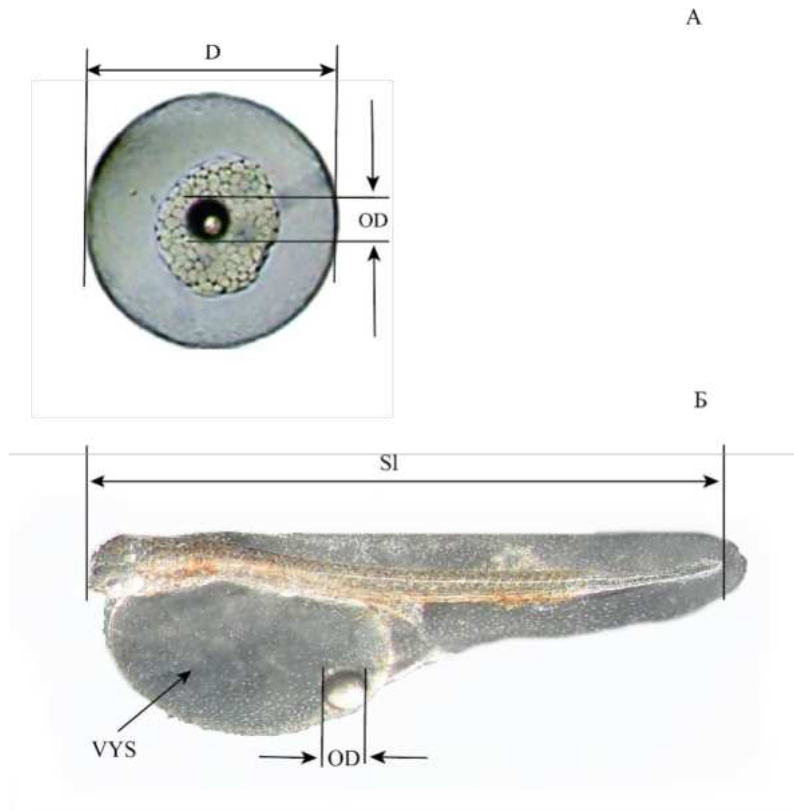


Рисунок 5 – Морфологические измерения икры и личинок камбалы калкана

Размеры, норму и аномалии развития икры и личинок определяли предварительно с помощью бинокляра МБС-2. Фотофиксацию проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse при увеличении 8×4 с видеокамерой, подключенной к компьютеру.

Выживаемость определяли методом ежедневного подсчета доли отхода икры (%) от момента посадки икры в инкубаторы вплоть до выклева личинок (~ 3 сутки). Оценку выживаемости и развития личинок производили на выклеве и каждые сутки до стадии перехода на внешнее питание после выклева (7 сут после оплодотворения, 3 сут после выклева) таким показателям, как доля выживших личинок (%), стандартная длина (SL, мкм), диаметр жировой капли (OD, мкм) и объем желточного мешка личинок (VYS, мкм³).

Оценка родительского (отцовского и материнского) влияния на характеристики камбалы калкана на этапах раннего онтогенеза.

Для изучения влияния родительского фактора на параметры личинок до начала экзогенного питания проводили отдельные оплодотворения икры разных

самок спермой разных самцов в нерестовый сезон 2007 г. ($n = 2$) в двух повторностях при температуре инкубации 16,5 °С и в 2009г ($n = 6$) в трех повторностях для каждого оплодотворения инкубируемых при трех температурах 15, 18 и 21 °С.

При оценке влияния «отцовского» эффекта использовали отдельные оплодотворения икры от одной самки спермой разных самцов 2007 г. (два скрещивания в двух повторностях) и в 2009 г. (два скрещивания в трех повторностях, инкубирование при трех различных температурах).

В процессе инкубации проводили оценку качества оплодотворенной икры, фиксировали норму и аномалии развития эмбрионов и личинок, а также их выживаемость и развитие. Эмбрионов оценивали на стадиях дробления, ранней и поздней бластулы, в процессе гастрюляции, в процессе органогенеза, на стадии нейрулы и стадии подвижного эмбриона. Оценку нормы и аномалий развития личинок, определяющих их жизнеспособность оценивали на выклеве (3–4 сут после оплодотворения икры) и при открытии рта перед переходом на внешнее питание (~7 сут после оплодотворения). Рассчитывали коэффициенты вариабельности для таких показателей как: диаметр овулировавшей икры (CV D), диаметр жировой капли (CV OD) (табл. 7), длина личинки на выклеве (CV SL), диаметр жировой капли личинки (CV OD личинки), желточный мешок (CV VYS).

Определение влияния температуры на развитие и выживаемость эмбрионов и личинок калкана, полученных от разных производителей в разные фазы репродуктивного цикла калкана.

Эмбрионов и личинок от каждой партии от одного скрещивания инкубировали при стабилизированной температуре 15, 18 и 21 °С в разные фазы нерестового сезона с апреля по июнь. Нерестовый сезон был условно разделен на следующие периоды: апрель – первые числа мая – начало сезона нереста; середина – конец мая – середина сезона; июнь – конец сезона.

Инкубацию икры проводили в стеклянных емкостях объемом 0,5 л. В каждую емкость отсаживали по 200 икринок. Ежедневно производился отбор отхода и замена воды. Выклюнувшихся личинок инкубировали в тех же емкостях и при той же температуре после 90% подмены воды.

Влияние гидрологического режима на выживаемость эмбрионов и выживаемость, и развитие личинок калкана.

В 2010 г. были проведены эксперименты развития и выживаемости икры и личинок при трех режимах барботажа при постоянной температуре 18 °С в двух повторностях. Режимы продувки воздухом: без барботажа, слабая продувка (0,56 мл/сек), сильная продувка (1,25 мл/сек).

В качестве инкубаторов использовали пластиковые емкости объемом 40 л. Для каждой повторности опыта брали около 3 тыс. оплодотворённых икринок. Для барботажа использовались мини-компрессоры. Подмена воды и чистка отхода производилась ежедневно.

2.4. Методы статистической обработки данных

Статистический анализ данных проводили в программе программах MS Excel и STATISTICA 10. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($M \pm SD$). На графиках использовали «коробочный» вид предоставления данных, где центральное значение – это медиана, в коробочке находится 50% данных, усы представляют собой 95 и 5 перцентилли.

Выборки данных были проверены на нормальность с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для сравнения достоверности различий выборок нормально распределенных данных использовали дисперсионный анализ (ANOVA), использовали критерий Фишера (F). Для данных, которые были распределены ненормально анализ различий между средними значениями проводили с помощью критерия Крускала–Уоллиса по рангам (H). Для оценки различий между двумя выборками использовали парные тесты U–Манна–Уитни (U) с поправкой Бонферрони. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Коэффициенты корреляции Пирсона использовали для изучения существующих взаимосвязей между биологическими характеристиками. Коэффициент корреляции Спирмена – между периодом нереста в разные годы и характеристикой подвижности сперматозоидов.

Для поиска возможной взаимосвязи переменных между биотическими и абиотическими факторами и показателями качества спермы калкана, провели разведочный анализ данных методом главных компонент. Для определения числа факторов использовали критерий Кайзера: выбрали факторы с собственными значениями равными или большими 1. Построили матрицу нагрузок факторов.

2.5. Модификация стандартного метода компьютерного анализа спермы рыб с использованием плагина wrMTrck_Batch

Для оптимизации процесса определения характеристик спермы мы разработали модификацию стандартного метода компьютерного анализа спермы рыб.

В программу ImageJ установили плагин **wrMTrck_Batch**, созданный автором Jesper Søndergaard Pedersen [Nussbaum-Krammer, 2015], для определения параметров движения *Caenorhabditis elegans*.

Использование плагина **wrMTrck_Batch**, предоставляет исследователю большую свободу в выборе параметров (Рисунок 6), наиболее подходящих для анализа движения различных объектов, при различных условиях. Плагин позволяет, в частности:

- 1) обрабатывать различные типы видеофайлов (сxd, avi, zip, mov);
- 2) автоматически отделять объекты от фона (способ автоматической настройки фильтра «Threshold» задается в начальном окне);
- 3) автоматически переводить видео в бинарное;
- 4) отслеживать движения объектов, учитывая следующие параметры (параметры задаются разово вручную при запуске плагина, файл с параметрами сохраняется в папке и в последующем его можно копировать, в этом случае параметры вносятся автоматически при открытии плагина):
 - минимальные и максимальные размеры объекта в пикселях,
 - максимальную скорость перемещения объекта между кадрами,
 - изменение площади объекта,
 - минимальное количество кадров, в течение которых движется объект;

5) производить запись дополнительных параметров (например, координаты перемещения XY);

6) пакетно обрабатывать массивы видеофайлов.

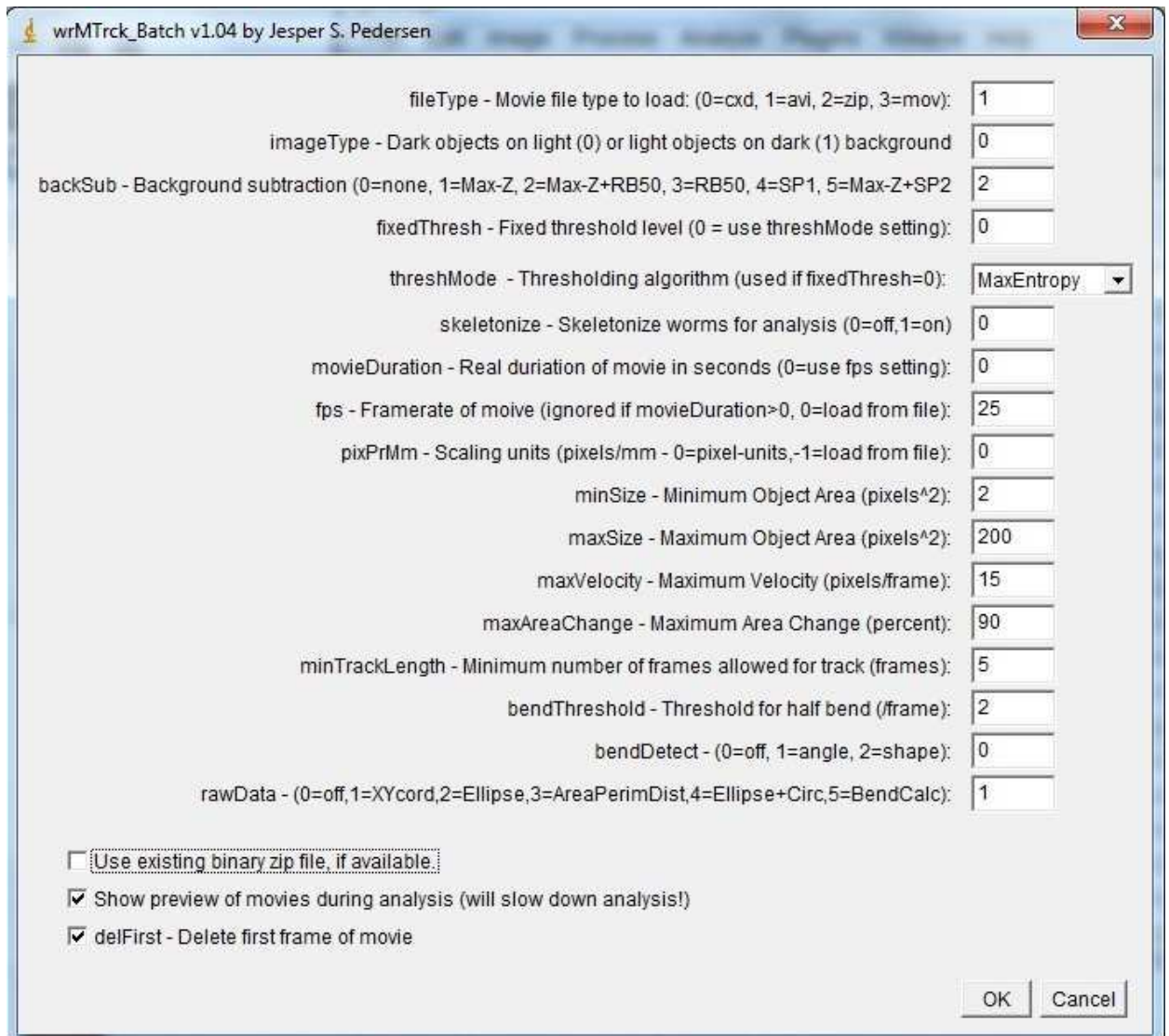


Рисунок 6 – Пример заполнения данными начального окна плагина wrMTrck_Batch

Начальные данные определяли следующим образом: в одном из видеороликов измеряли минимальные и максимальные размеры объекта в пикселях с помощью инструмента Oval. Им вручную измеряли видимые площади головки самого малого и самого большого сперматозоида, наблюдаемые на протяжении всего видеоролика, далее выбирали в меню пункт Analyze/Measure и определяли площадь

в пикселях. Учет изменения площади движущегося объекта актуален при обработке видеофайлов с мелкими, быстро передвигающимися объектами, такими как сперматозоиды рыб. Так видимая часть головки сперматозоида может частично уходить в толщу жидкости в процессе записи видео, из-за чего, меняется ее видимая площадь. По нашим расчетам предпочтителен показатель изменения площади объекта, равный 90 %.

Максимальную скорость перемещения объекта между кадрами необходимо устанавливать в зависимости от его средней скорости, учитывая общее количество объектов и их расстояние друг от друга. Для измерения максимальной скорости перемещения объекта между кадрами измеряли дистанцию, преодолеваемую одним из самых быстрых сперматозоидов (скорость определяли визуально) между двумя соседними кадрами, обозначив инструментом *Straight*, начальную точку на первом кадре, а конечную на втором. Далее выбирали *Analyze/Measure* и определяли длину полученного отрезка в пикселях. Для сперматозоидов самцов из популяции черноморской камбалы калкана данное значение в среднем составляло 20 пк/кадр. В поле зрения находилось около 1 тыс. сперматозоидов, площадь их головок составляла от 3 до 90 пк, т. е. объекты находились достаточно близко друг к другу. Скорость движения, подсчитанная вручную с помощью инструмента *Straight*, была равна 3–10 пк/кадр, отдельные сперматозоиды (не более 1 %) передвигались со скоростью более 20 пк/кадр. Опытным путем было вычислено, что при установке значения максимальной скорости выше 20 пк/кадр, программа начинает ложно распознавать соседние объекты. При значительном уменьшении этого параметра не учитывается часть быстродвижущихся сперматозоидов.

Минимальное количество кадров, в течение которых движется объект, составляли равным 5–7 кадров, т. к. сперматозоиды быстро уходят из поля зрения.

После внесения начальных данных (Рисунок 6), файл с настройками можно копировать и в дальнейшем заново не вносить значения в меню настроек плагина.

Пакетная обработка файлов значительно экономит время исследователя, позволяя подвергать анализу целые папки с вложенными видеофайлами. После обработки видеофайлов (Рисунок 7) плагин автоматически сохраняет результаты

для каждого файла отдельно в формате «txt» (с именем соответствующего видеофайла), а также сохраняет итоговую таблицу по всем проанализированным файлам.

Для получения значений скоростей движения всех объектов в кадре, медиан и средних, доверительных интервалов, а также для подсчета процента подвижных сперматозоидов в пробах были написаны макросы под Excel, позволяющие обрабатывать txt-файлы с данными.

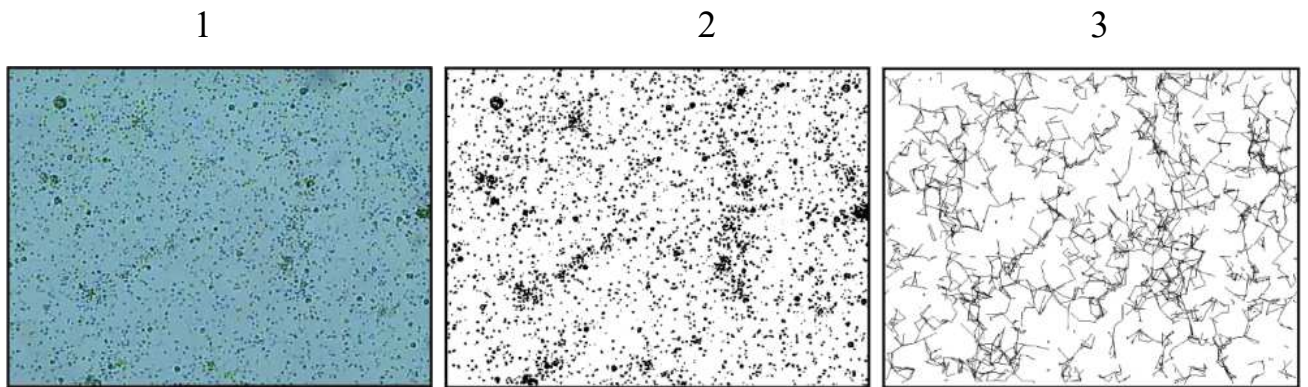


Рисунок 7 – Этапы обработки видеоизображения движения сперматозоидов камбалы в программе ImageJ 1) загрузка видеофайла в формате avi; 2) перевод цветовой схемы в бинарную с помощью фильтра Threshold; 3) построение траектории движения отслеживаемых объектов.

Плагин wrMTrck_Batch в авторской редакции не позволяет подсчитать одновременно скорость движения всех объектов в кадре, медиан и средних, доверительных интервалов, а также процент подвижных сперматозоидов в пробе. Для обработки txt-файлов с данными, полученными плагином wrMTrck_Batch в ImageJ, были написаны макросы под Excel.

Макрос для сбора txt-файлов для каждой пробы, который позволяет:

- 1) выбирать нужные txt-файлы в каждой папке;
- 2) создавать новый лист Excel с данными каждого txt файла, называя лист именем файла;
- 3) создавать отдельный лист, в котором содержатся подсчитанные плагином значения: средние скорости по прямолинейной и криволинейной дистанции, до-

верительный интервал, процент подвижных сперматозоидов (соотношение количества сперматозоидов в кадре, движущихся со скоростью более 20мкм/с, к общему количеству сперматозоидов), номер пробы, номер повторности;

4) сохранять полученный xls-файл в выбранную папку под заданным именем.

Собирать данные в одну «книгу» сразу для всех проб и всех разбавлений нецелесообразно, т. к. результирующий файл содержит огромное количество страниц и при открытии сильно загружает оперативную память компьютера.

Для сбора результатов в сводную таблицу по всем файлам был написан макрос, позволяющий выбирать «книги» xls, из которых необходимо собрать итоговые данные, и сохранять новую «книгу» под заданным именем.

Полученная «книга» Excel содержит один лист и одну таблицу со следующими данными: номером самца, от которого получена проба, временем записи видеофайла, повторностью, средними скоростями движения сперматозоидов, доверительным интервалом, количеством подвижных сперматозоидов, общим количеством сперматозоидов, процентом подвижных сперматозоидов в пробе.

Применение вышеописанного авторского алгоритма подсчета основных характеристик движения сперматозоидов с использованием плагина wrMTrack_Batch и написанных макросов позволяет значительно сократить время обработки начальных данных: на получение сводной таблицы характеристик движения сперматозоидов в 405 пробах (около 2 000 нарезанных видеороликов) затрачивается не более 30 мин [Baiandina, 2019].

РАЗДЕЛ 3. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ХАРАКТЕРИСТИК СПЕРМЫ КАМБАЛЫ КАЛКАНА

3.1. Влияние способа подготовки препарата спермы для микроскопирования на характеристики движения сперматозоидов

Сравнение данных, полученных при применении стандартной методики и собственной модификации показали, что способ подготовки препарата спермы для микроскопирования оказывает существенное влияние на все характеристики активности сперматозоидов: процент подвижных сперматозоидов, скорость и длительность движения.

В 2007 г. при приготовлении мазка спермы для видеорегистрации использовали стандартную методику [Павлов, 2006], в которой мазок накрывается покровным стеклом [Баяндина, 2007]. В 2008 г. на основании визуальной оценки разницы подвижности сперматозоидов в мазке с покровным стеклом и без него разработана собственная модификация метода подготовки препарата для записи видео движения сперматозоидов в образце [Баяндина, 2013], используемая и в последующих исследованиях. Каплю разбавленной спермы объемом 0,1 мл наносили на предметное стекло таким образом, чтобы суспензия не растекалась по стеклу, а сперматозоиды не увлекались током жидкости (предметное стекло предварительно обезжиривали, что позволяло жидкости распределиться равномерно, не образуя куполообразную каплю). В таком объеме можно выделить три «слоя»: поверхностного натяжения – сперматозоиды слабо подвижны, прилипают к пленке поверхностного натяжения; у поверхности предметного стекла – хвосты сперматозоидов не в состоянии двигаться свободно, прилипают к стеклу; внутренний слой относительно свободного движения – сперматозоиды движутся заметно активнее (в 5–10 раз быстрее). Видеорегистрацию сперматозоидов производили в среднем слое.

Данные активности спермы, полученные по разным методикам в 2007–2008

достоверно отличались ($p \leq 0,05$). Так средняя скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции в видео образцах, полученных в 2007 г., составляла 38 мкм/с, а с применением обновлённой методики в 2008 г. этот показатель в среднем был в три раза больше (125 мкм/с). Максимальная скорость отдельных сперматозоидов в 2007 г – 354 мкм/с, по сравнению максимальной скоростью, зарегистрированной в 2008 г. при применении модифицированной методики составила 427 мкм/с. Средняя доля подвижных сперматозоидов в пробах 2007 г. составляла 17 % и не превышала 47 %, в 2008 г. процент подвижных сперматозоидов, активированных морской водой, достигал 99 %. (Рисунок 8).

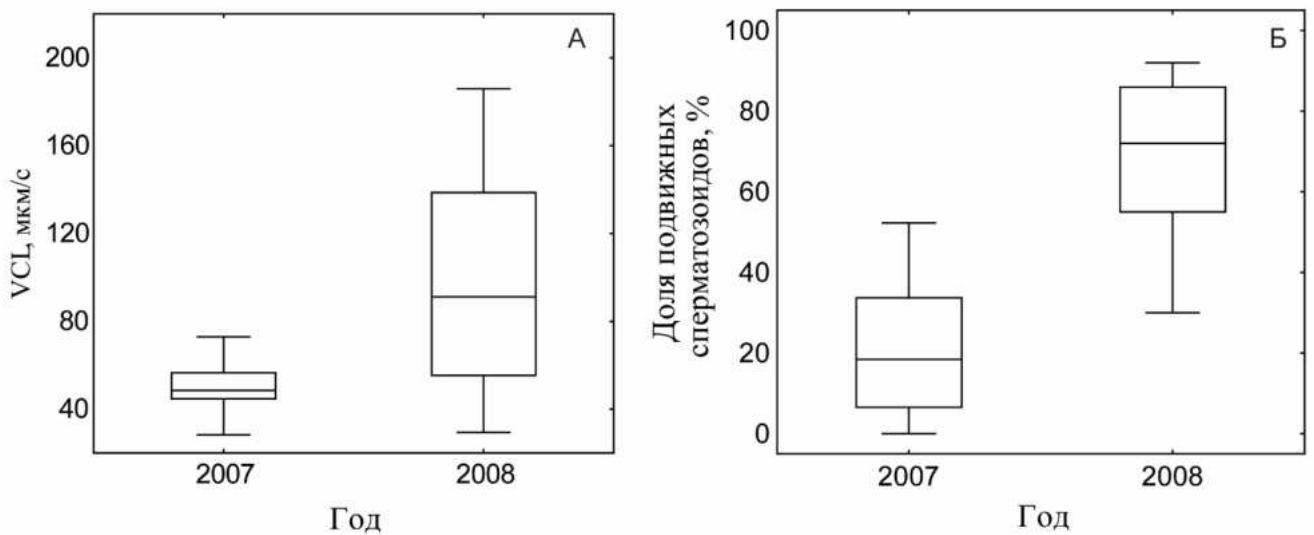


Рисунок 8 – Скорости движения (А) и процент подвижных сперматозоидов (Б) при применении стандартной (2007 г.) и модифицированной методики (2008 г.)

Сравнение данных, полученных в 2007 и 2008 гг., позволило нам выбрать наиболее удачную с нашей точки зрения методику. Очевидно, в дальнейшем данные для подсчета общих характеристик спермы камбалы, полученные в 2007 г., не могли быть использованы для сравнения межгодовой изменчивости (2007–2014 гг.) характеристик спермы.

Время подвижности сперматозоидов после активации, в образцах, подготовленных для микроскопии стандартным методом, не превышало 15 мин., в то время как при микроскопировании модифицированным методом, была зарегистрирована рекордная для рыб продолжительность движения сперматозоидов после активации. Сперматозоиды в пробах, полученных от двух самцов продолжали движение после разбавления морской водой в течение 7 часов при 25 °С.

Проведенные нами исследования позволили установить, что стандартная методика подготовки препарата спермы для микроскопирования, с использованием покровного стекла, оказывает негативное влияние на движение сперматозоидов. Как известно, движение сперматозоида происходит за счет колебательных движений его хвоста. В слое жидкости, находящейся между предметным и покровным стеклом, часть сперматозоидов прижимается к поверхности стекла, блокируя колебания хвоста, таким образом, сперматозоид движется с минимальной скоростью.

Метод оценки характеристик движения сперматозоидов в свободной капле на предметном стекле не препятствует движению сперматозоидов и является оптимальным для микроскопирования разбавленной спермы с целью выяснения характеристик ее движения.

3.2. Влияние степени разбавления спермы на характеристики активности сперматозоидов

В лаборатории проводили эксперименты по разбавлению спермы, полученной от трех самцов, отловленных в 2008 г. в разных соотношениях (1:10 и 1:100) стерильной морской водой.

Средняя скорость сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL) сразу после активации морской водой при разведении в соотношении 1:10 составила 85 ± 20 мкм/с, максимальная – 123 мкм/с, средний процент подвижных сперматозоидов во всех образцах составил 80%, для сперматозоидов при разведении в со-

отношении 1 : 100 – 46 ± 16 мкм/с, максимум 97 мкм/с, средняя доля подвижных сперматозоидов во всех образцах составляла 28 %. Через 20 минут при разбавлении в соотношении 1:10 средние скорости были равны $VCL = 61 \pm 20$ мкм/с, максимальная скорость – 90 мкм/с, доля подвижных сперматозоидов – 66 %, для 1:100 – $VCL = 36 \pm 10$ мкм/с, максимум – 38 мкм/с, 27 % соответственно.

Таким образом, мы обнаружили существенные различия в скорости и процентном содержании подвижных сперматозоидов при разных разведениях спермы самца 1 и самца 2 (Рисунок 9). Достоверно более высокие показатели доли подвижных сперматозоидов и их средние скорости зарегистрированы для минимального разведения ($N = 293,2$, $p = 0,0001$ и $N = 187,3$, $p = 0,0001$ соответственно). В течение 20 минут после активации мы не наблюдали достоверного снижения средней скорости ($N = 2$, $p = 0,1$) и доли подвижных сперматозоидов ($N = 1,6$, $p = 0,2$) при любом разбавлении.

Таким образом показано, что для полной активации спермы калкана [Баяндина, 2013], достаточно 10 % растворения семенной жидкости в морской воде, так же, как и для атлантического тюрбо [Suquet, 1993], самая высокая активность спермы достигается при её разбавлении не более 1:10 [Baiandina, 2021].

Наши данные согласуются с данными, полученными [Suquet, 1992], так сперма атлантического тюрбо, активированная морской водой в соотношении 1:10, сохраняет активность дольше, а процент подвижных сперматозоидов выше, чем при разведении 1:100. При 10-кратном увеличении разведения (до 1:100) процент подвижности снижался в среднем на 25–50 %. Продолжительность подвижности сперматозоидов в экспериментах [Suquet, 1992] при разведении 1:10 составляла 8 минут, а при разведении 1: 100 всего 5 мин. В наших экспериментах мы вообще не зарегистрировали значительного снижения подвижности сперматозоидов в течение 20 минут при любом разведении. Однако, при высоких разведениях спермы характеристики движения сперматозоидов также были ниже в среднем на 25–30 %, чем при разведении 1:10.

Для европейского окуня *Perca fluviatilis* максимальная скорость сперматозоидов и самый высокий процент подвижных сперматозоидов зарегистрирован после активации спермы при разбавлении в соотношении 1:50, по сравнению с разбавлением 1:100 [Alavi, 2007].

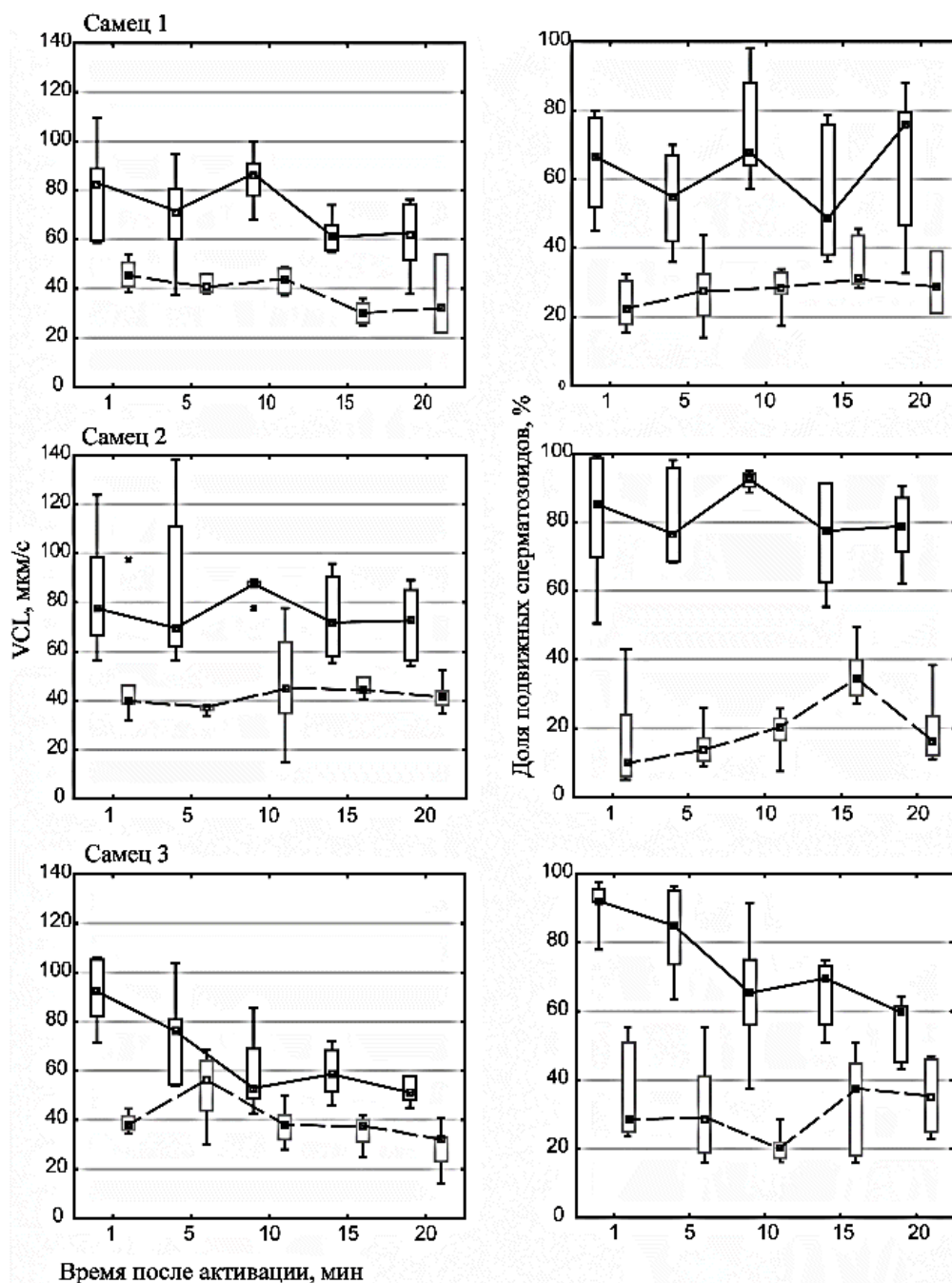


Рисунок 9 – Средняя скорость и доля подвижных сперматозоидов от трех разных самцов калкана в течение 20 минут после активации. Сплошная синяя линия – разбавление спермы в соотношении 1:10, пунктирная красная линия – 1:100. Представлены медианы значений, коробочка 25 и 75 %, усы 5 и 95 %

Показано [Cosson, 2008], что при разведении спермы тюрбо морской водой более чем в 10 раз снижается процент оплодотворения. Возможно, это связано с высоким содержанием белков и, в частности, липопротеинов в сперме камбалы, способных защитить сперматозоиды от агрессивной гиперосмотической среды [Billard, 1986].

Степень разбавления спермы активирующей средой влияет на успешность оплодотворения, т.к. при увеличении разбавления изменяются параметры по-движности сперматозоидов, такие как скорость, процент подвижных сперматозоидов и общий период их подвижности.

3.3. Динамика активности спермы калкана в зависимости от времени после активации

Анализ результатов экспериментов по определению динамики характеристик спермы в зависимости от времени после активации показал, что повышение и снижение средней скорости движения сперматозоидов по криволинейной траектории (Рисунок 10) соответствует повышению и снижению процента активных сперматозоидов. Исключения получены только для двух образцов спермы (4 и 10), у которых повышение средней скорости движения сопровождалось снижением процента подвижных сперматозоидов.

Сразу после активации спермы морской водой наблюдали среднюю скорость движения (от 74 до 175 мкм/с) и долю подвижных сперматозоидов (от 73 до 99 %) (Рисунок 10).

Наилучшие показатели по скоростям и доле подвижных сперматозоидов были отмечены для образцов спермы № 1, 2, 8 у которых сразу после разбавления эякулята морской водой (0 минут) обнаружена 99 % активность сперматозоидов, средние скорости движения сперматозоидов составили 175, 170, 164 мкм/с, соответственно.

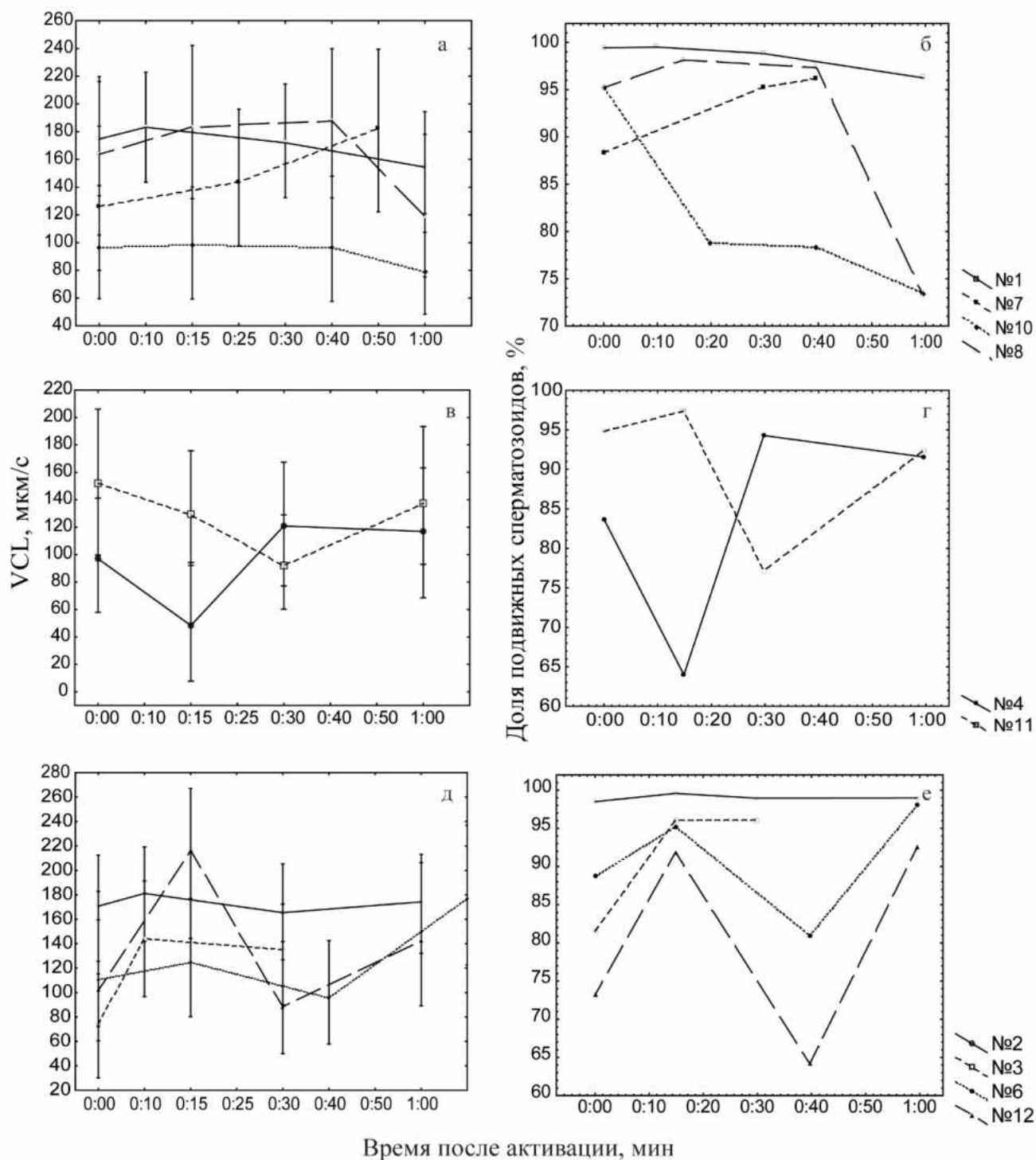


Рисунок 10 – Средняя скорость движения (а, в, д) и доля подвижных сперматозоидов (б, г, е) самцов камбалы калкана в зависимости от времени после активации

По динамике характеристик подвижности спермы из разных проб условно было выделено три типа (1–3) изменения средних скоростей, рассмотренных ни-же:

1. Плавное изменение скоростей (Рисунок 10 а, б) (№ 1, 7, 8, 10).

Достаточно высокие скорости (97–177 мкм/с) сразу после активации, незначительное повышение скоростей в течение первых 10–20 мин после активации (99–183 мкм/с), и в дальнейшем – снижение скоростей. Для пробы спермы от самца №7, наблюдали резкое повышение средних скоростей движения до 183 мкм/с. Доля подвижных сперматозоидов сразу после активации для данных проб составляла 88–99,5 % и снижалась к концу эксперимента до 73 % для проб №8 и № 10, 96 % для пробы №1.

2. Косинусоидальный характер динамики активности (Рисунок 10 в, г) (№ 4, 11)

Диапазон скоростей в первую минуту после активации составлял 97–152 мкм/с, через 10–15 мин наблюдали резкое снижение скоростей (48–129 мкм/с), к концу эксперимента, т. е. через 1 час после разбавления, скорость движения сперматозоидов была в среднем выше (117–137 мкм/с для каждой пробы соответственно) таковой сразу после разбавления. Графики изменения доли подвижных сперматозоидов с течением времени (Рисунок 10 г) так же демонстрируют скачкообразное изменение доли подвижных сперматозоидов после разбавления.

3. Синусоидальный характер динамики активности (Рисунок 10 д, е) (№ 2, 3, 6)

Скорости сразу после разбавления находятся в диапазоне от 74 до 170 мкм/с, доля подвижных сперматозоидов 73–98 %, в течение первых 15 мин резкий подъем скоростей (124–216 мкм/с) и доли подвижных сперматозоидов (92–99,6 %), через 30–40 минут падение скоростей (88–165 мкм/с) и доли подвижных сперматозоидов (до 64 %) и затем новый скачек средних значений (142–176 мкм/с и 93–99 %).

Для 8 самцов калкана проанализировано движение сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL) и доля подвижных сперматозоидов в течение 240 мин после активации спермы морской водой (Рисунок 11).

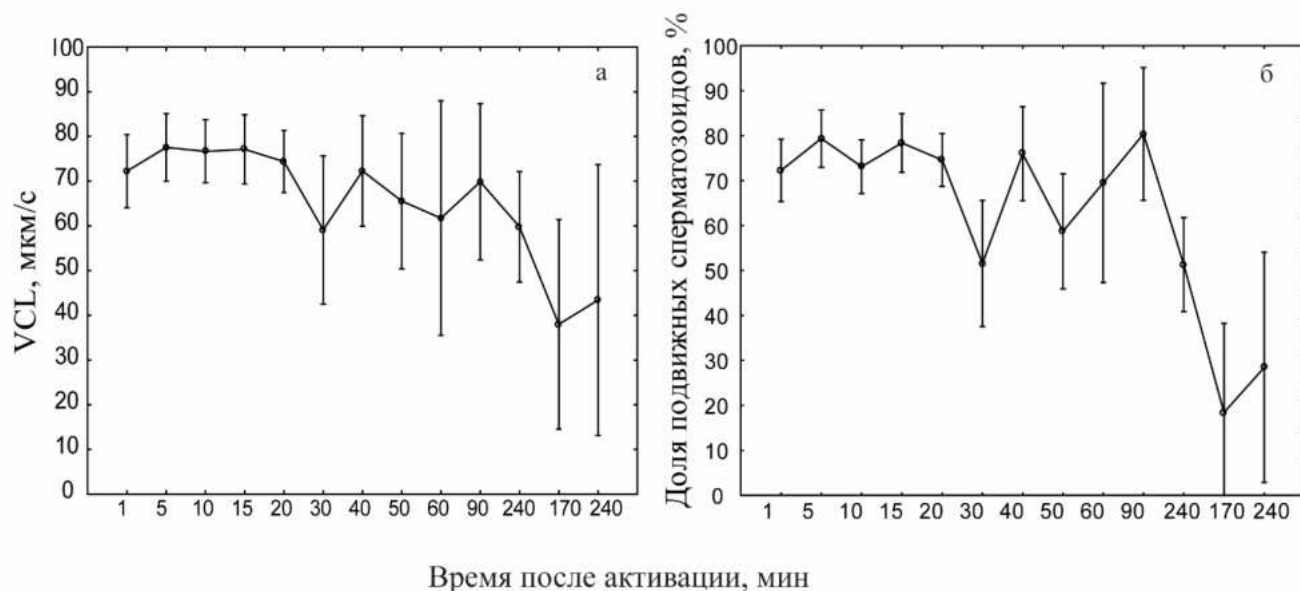


Рисунок 11 – Средние (для 8 самцов) скорости движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL) (а) и доли подвижных сперматозоидов (б) в течение 240 мин. после активации.

Было показано, что сразу после активации спермы морской водой и в течение первых 20 мин сохраняется высокий процент подвижных сперматозоидов практически во всех пробах, через 30 мин после активации средние показатели активности достоверно снижаются. Однако у части самцов высокие показатели сохраняются и через 60 мин после активации спермы.

В эксперименте по динамике изменения характеристик спермы в течение 7 часов после активации спермы морской водой (10:1) у двух (№ 11 и № 12) из трех проб было обнаружено длительное сохранение значительной доли подвижных сперматозоидов (Рисунок 11). Через час после активации 80–93 % сперматозоидов сохраняли 45–80 % от максимальной подвижности – и двигались со средней скоростью 150 мкм/с (Рисунок 11).

Через семь часов после разбавления спермы морской водой происходил значительный спад средней скорости и доли подвижных сперматозоидов, однако, доля подвижных сперматозоидов составляла еще значительный ресурс – 15–35 % - с относительно высокими значениями скорости отдельных сперматозоидов до 130 мкм/с, и средней скоростью в пределах 80–85 мкм/с (Рисунок 12).

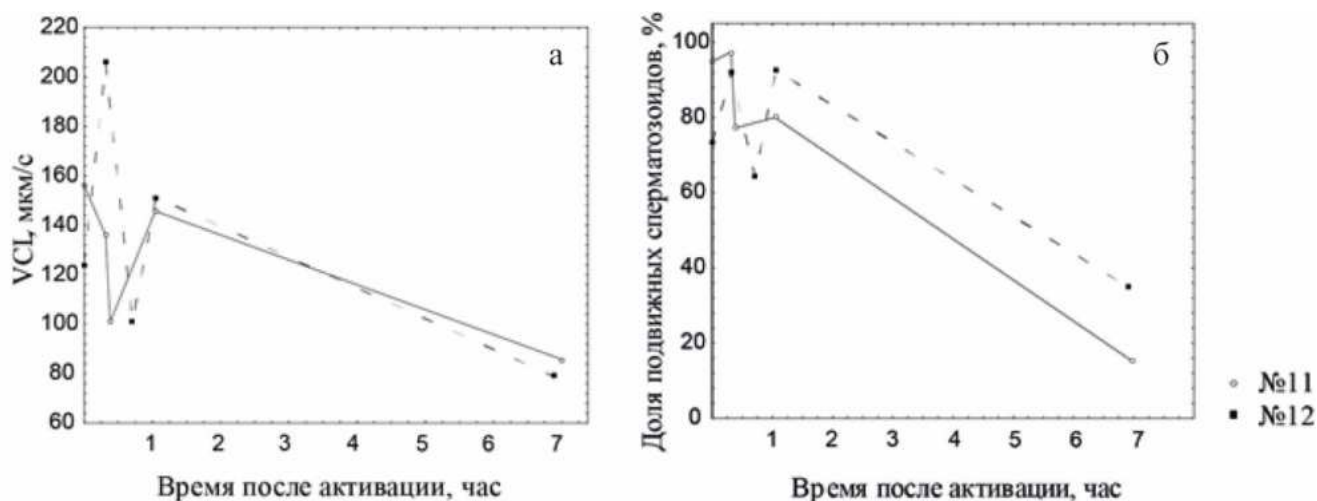


Рисунок 12 – Скорость движения (а) и доля подвижных (б) сперматозоидов самцов камбалы калкана в зависимости от времени после активации

Полученные нами данные по продолжительности движения сперматозоидов калкана до полной остановки (> 7 ч) существенно отличаются от известных для других видов рыб. В литературе встречаются противоречивые сведения относительно длительности активности спермы тюрбо. Например, при использовании методики однократного разбавления спермы балтийского тюрбо морской водой, 60 % сперматозоидов сохраняли подвижность от исходной на протяжении 1 часа [Geffen, 1993]. При использовании двойного разбавления (свежая сперма разводилась в соотношении 1:24 деактивирующей средой, а затем активирующей средой) длительность подвижности спермы тюрбо составляла 1–17 мин [Cosson, 2008; Suquet, 1994.].

Наши исследования позволяют утверждать, что после разбавления морской водой (в соотношении 1:10) через 10 и более минут происходит максимальная активация сперматозоидов. В течение часа наблюдаются пики максимумов и мини-

мумов активности. Затухание подвижности сперматозоидов происходит неравномерно [Баяндина, 2013].

Так как существует зависимость между подвижностью сперматозоидов и их оплодотворяющей способностью [Гинзбург, 1968], можно предположить, что фертильность спермы калкана в отдельных случаях может сохраняться до 7 часов после активации морской водой.

Наблюдаемые периоды активности не совпадают с фазами подвижности сперматозоидов, выделенными ранее для *Scophthalmus maximus*. Возможно, различия в характеристиках подвижности спермы черноморского калкана и атлантического тюрбо связаны с тем, что большинство исследователей для активации спермы используют методику двойного разбавления: сначала эякулят предварительно разводят в растворе, дезактивирующем сперматозоиды; а затем в активирующем растворе до достижения конечной концентрации сперматозоидов в соотношении 1:1000 [Cosson, 2008]. Однако, было показано для атлантического тюрбо [Suquet, 1995] также, как и нами для черноморского калкана [Baiandina, 2021], что увеличение степени разбавления может значительно снизить процент подвижных сперматозоидов. Поэтому мы уверены, что сравнение характеристик активности сперматозоидов при разных разведениях некорректно.

Оплодотворение икры морских рыб, как в море, так и в условиях марикультуры, осуществляется непосредственно в морской воде, в которой позже происходит развитие эмбрионов и личинок. Поэтому при оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов рыб и характеристик их движения предпочтительно использовать разбавление спермы морской водой [Holt, Van Look, 2004].

3.4. Межгодовые показатели характеристик активности спермы калкана

Анализ результатов исследований спермы калкана (на примере сравнения 2008, 2010, 2012–2014 гг.) показал, что в эякуляте половозрелых самцов в период нереста характеристики активности сперматозоидов (средняя скорость движения

сперматозоидов по криволинейной дистанции и доля подвижных сперматозоидов) могут варьировать как по индивидуальным, так и по межгодовым показателям.

Межгодовые вариации подвижности спермы самцов калкана рассмотрены на примере разных (2008, 2010, 2012–2014 гг.) нерестовых популяций калкана Севастопольского региона. Независимо от сезона нереста активная сперма была зарегистрирована у 90 % самцов из числа «текучих» из нерестовой популяции 2008, 2010, 2012–2014 г. и в среднем по годам скорость сперматозоидов по криволинейной траектории составила 100 ± 52 мкм/с.

Процент подвижных сперматозоидов в активированных черноморской водой индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана в 2008 г. варьировал в пределах 30–90 %, а в 2010 г. – в 70–99 %, в 2012, 2013 и 2014 гг. в пределах 38–98 %, 15–95 % и 20–99 %, соответственно (Рисунок 13).

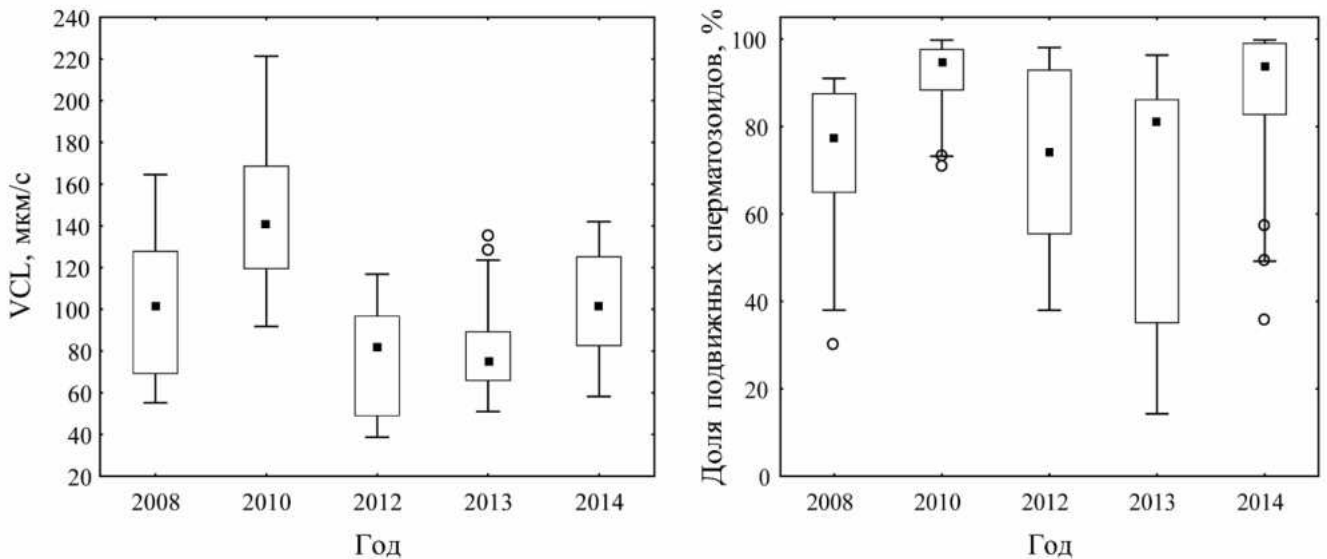


Рисунок 13 – Изменение средней скорости (VCL, мкм/с) и доли подвижных сперматозоидов в 2008, 2010, 2012–2014 гг.

Максимальная скорость отдельных сперматозоидов спермы самцов из нерестового стада за 2008, 2010, 2012 – 2014 гг. была зарегистрирована в 2010 г. и составила 430 мкм/с. Среднестатистические показатели доли ($N = 17,8$; $p = 0,0014$) и скорости подвижных сперматозоидов ($N = 34,9$; $p = 0,0001$) у самцов калкана из

нерестовой популяции 2010 г. оказались значимо выше по сравнению с нерестовыми популяциями других годов [Baianina, 2022].

Характеристики сперматозоидов одного и того же вида рыб могут изменяться в зависимости от среды обитания и ухудшаются в стрессовых условиях, качество спермы зависит от комбинированного взаимодействия между генетическими, физиологическими и экологическими факторами [Kowalski, Sejko, 2019]. Показано, что популяции рыб р. *Scophthalmus* из разных локальных популяций, находящихся в разных экологических условиях, особенно в условиях разной антропогенной нагрузки, в частности, по концентрации ксенобиотиков, могут значимо отличаться по характеристикам спермы: концентрации, морфологии и энергетическому состоянию сперматозоидов. Так, в условиях более высокого загрязнения токсичными химическими компонентами и более распреснённого Гданьского залива у самцов тюрбо наблюдали не только повышенную концентрацию токсинов в гонадах, но и снижение размерных характеристик сперматозоидов по сравнению с тюрбо из Померанской бухты, которую характеризуют более динамичный водообмен, более высокой солёностью и большей вариабельностью сезонных температур [Gosz, 2010, 2011].

Анализ единичных данных о температуре вод Юго-Западного шельфа Крыма в 2010 г показал, что в течение зимне-весенних месяцев температура слоев воды ниже 50 м (основные глубины обитания черноморского калкана в преднерестовый и нерестовый период) не опускалась ниже 8,4 °С, в то время как в другие годы наших наблюдений придонная температура была ниже 8 °С. Так в середине мая 2008 года (пик сезона нереста) температура воды составляла 7,7 °С на глубине 60 м и 14,5 °С на поверхности, по сравнению с 8,5 °С на глубине 60 м и 15,8 °С на поверхности в те же даты в 2010 году [Мельник, 2019].

Характеристики спермы диких самцов черноморского калкана из нерестовой популяции 2010 года, сходны с характеристиками спермы самцов черноморского калкана, выращенных в условиях марикультурного хозяйства, с оптимальными условиями содержания рыбы, а именно стабильной температуре и подобранным рационом питания. В работе [Polat, 2014] сообщается о высокой

средней доле подвижных сперматозоидов 92,4 % и продолжительности их подвижности около 30 минут. Это сходство может означать, что самцы в 2010 году питались лучше в преднерестовый период, чем самцы в 2007, 2008, 2013 и 2014 г. Таким образом, возможно, что высокое качество спермы, обнаруженной в период нереста 2010 года, было также связано с лучшим питанием самцов в преднерестовый период.

Сперма тюрбо содержит большое количество белка и липидов [Suquet , 1994], в частности липопротеинов, сперма черноморского калкана содержит большое количество докозагексаеновой кислоты (21,6 %) – незаменимой полиненасыщенной жирной кислоты класса Омега-3 [Дрокин, 1993]. Соотношение основных компонентов рациона питания оказывают влияние на механизмы осморегуляцию сперматозоидов, а полиненасыщенные жирные кислоты влияют на подвижность сперматозоидов. Было обнаружено, что пищевая добавка витамина Е увеличивает содержание полиненасыщенных жирных кислот в сперме тюрбо и улучшает качество ее спермы [Ху, 2015]. В свою очередь, известно, что качество спермы тюрбо, оказывает влияние на состояние здоровья потомства в раннем онтогенезе [Liu, 2021].

В работе [Turan, 2019] показано, что в Черном море у берегов Крыма, Болгарии и Турции обитает популяция калкана, единая по генетическим признакам, высокие показатели характеристик спермы самцов из уловов 2010 г. вряд ли можно объяснить миграцией других популяций к Севастопольскому побережью. В свою очередь, совокупность биологических отличий производителей нерестового стада 2010 г. от производителей нерестовых стад предшествующих и последующих лет позволяет предположить, что популяция 2010 г., нерестившаяся в локальных водах Севастополя, возможно, находилась в оптимальной экологической обстановке в преднерестовый период, либо мигрировала из других районов моря с такими условиями.

Можно предположить, что в благоприятных экологических условиях характеристики спермы калкана будут приближаться к таковым у нерестовой популяции 2010 г.

3.5. Вариабельность характеристик спермы камбалы калкана в зависимости от фазы нерестового периода

Для оптимизации процесса искусственного выращивания камбалы калкан необходимо установление количественных и качественных характеристик половых продуктов самцов в зависимости от фазы нерестового периода.

Были рассчитаны парные коэффициенты корреляции между фазами нерестового сезона по годам и такими характеристиками спермы, как скорость движения и процент подвижных сперматозоидов. Рассчитаны коэффициенты вариации скорости движения сперматозоидов в пределах выделенных фаз сезона в 2007, 2008 и 2010 гг. (таблица 1). В 2012–2014 гг. из-за недостаточности выборки проб спермы самцов в разные даты нерестового сезона отсутствовала возможность проследить зависимость изменения скоростей.

Таблица 1 – Коэффициенты корреляции между фазами нерестового сезона по годам и такими характеристиками спермы, полученной от самцов из нерестовых популяций 2007, 2008, 2010 гг.

Фаза нерестового сезона	2007		2008		2010	
	VVCL	Доля подвижных сперматозоидов	VVCL	Доля подвижных сперматозоидов	VVCL	Доля подвижных сперматозоидов
	0,27 p=0,05	0,61 p=0,0001	0,42 p=0,03	0,08 p=0,702	0,01p p=0,94	-0,21 p=0,22

Так видно, что для проб, отобранных в 2007 г., доля подвижных сперматозоидов коррелировала с фазой нерестового сезона и коэффициент вариации был равен 0,61 при $p = 0,0001$, в 2008 г. коэффициент был значительно ниже 0,42, при $p = 0,3$. Скорость движения сперматозоидов значимо не изменялась в течение нерестового сезона. В 2010 г. корреляции между

характеристиками спермы и фазой нерестового сезона не обнаружено.

Таблица 2 – Средние значения характеристик спермы калкана в разные фазы нерестовых сезонов 2007,2008, 2010 гг.

Фаза сезона	Год	Количество проб	VCL мкм/с	Коэффициент вариации VCL, %	Доля подвижных сперматозоидов, %
Начало сезона	2008	11	74	61	66
Начало сезона	2010	12	148	49	94
Середина сезона	2007	52	33	301	19
Середина сезона	2008	9	110	53	76
Середина сезона	2010	12	134	53	90
Конец сезона	2007	23	49	455	28
Конец сезона	2008	6	117	52	67
Конец сезона	2010	9	151	49	90

Наибольшие коэффициенты вариаций скоростей движения сперматозоидов рассчитаны для проб от самцов, выловленных в начале сезона нереста, что, возможно, свидетельствует о разном физиологическом состоянии и асинхронности сперматогенеза отдельных особей.

Несмотря на то, что в 2007 и 2008 гг. для определения характеристик спермы использовали различные методики подготовки препарата спермы для микроскопирования, можно сравнивать тенденцию увеличения скорости процента подвижных сперматозоидов под конец нерестового сезона 2007 и 2008 гг. (таблица 2).

В 2010 г. такой закономерности не прослеживали (Рисунок 14), хотя средняя скорость движения и процент подвижных сперматозоидов был значительно выше в начале (149 мкм/с, 94 %) и середине сезона (134 мкм/с, 90 %), по сравнению с 2008 г. (в начале нереста 74 мкм/с и 66 %, в середине 110 мкм/с и 76 %). В конце сезона в 2010 г. эти показатели составили соответственно 151 мкм/с и 90 %, 2008 г – 117 мкм/с и 67 %. Повышение средней скорости движения и процента подвижных сперматозоидов в 2010 г. возможно связано, с более высокими весенними температурами в этом году, по сравнению с 2008 г.

Для установления тенденции изменения характеристик спермы в течение нерестовых сезонов, проводили сравнения усредненных данных характеристик

спермы камбалы калкана, полученных в 2007, 2008, 2010 гг. в зависимости от фазы репродуктивного сезона.

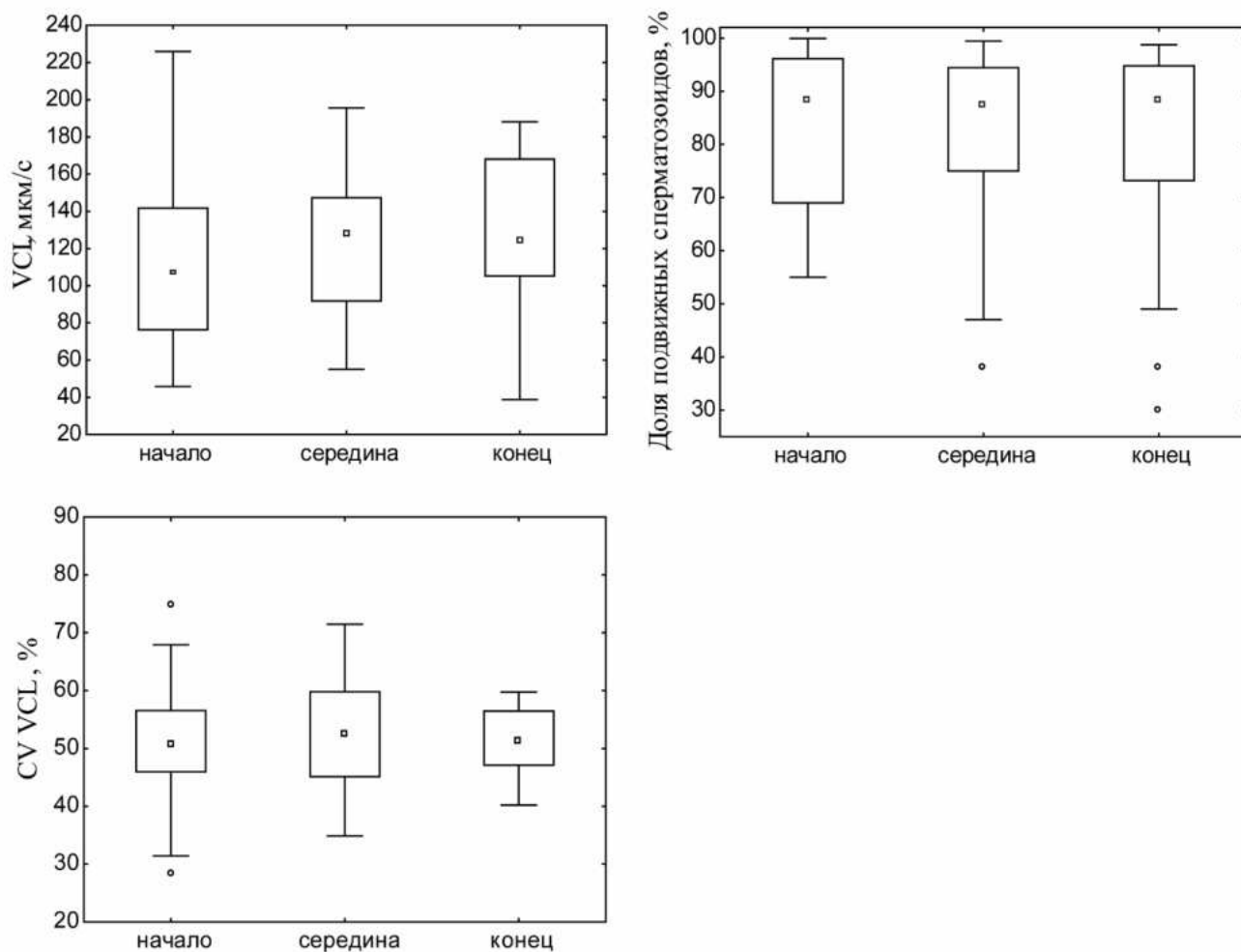


Рисунок 14 – Изменение средней скорости движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL, $\mu\text{m}/\text{c}$) доли подвижных сперматозоидов (%) и коэффициента вариации средних скоростей (CV VCL, %) в различные фазы нерестового периода 2007, 2008 и 2010 гг.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса не выявил достоверных отличий скорости ($H = 1,73$, $p = 0,62$) и доли подвижных сперматозоидов ($H = 4,9$, $p = 0,18$) в течение разных фаз нерестовых сезонов [Baiaandina, 2022].

3.6. Оценка связи между размерно-возрастными и биологическими характеристиками самцов и свойствами спермы калкана

Для установления наличия связей между размерно-возрастными и физиологическими характеристиками самцов был проведен корреляционный анализ между такими характеристиками как: скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции, длина самца, соматический вес, вес печени и гонад. Данные по биоанализу калкана предоставлены вед. н. с. отдела аквакультуры и морской фармакологии ИнБЮМ к.б.н. В. Е. Гирагосовым.

Между размером, возрастом, упитанностью самцов калкана (общим весом, весом печени и весом гонад) и характеристиками их спермиации (объем, концентрация и подвижность спермиев) не было обнаружено достоверной корреляции [Баяндина, 2013; Baiandina, 2022]. Результаты корреляционного анализа не выявили достоверных закономерностей изменения скорости движения сперматозоидов и доли подвижных сперматозоидов в сперме калкана в зависимости от фазы нерестового сезона по всем годам (таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициент корреляции Пирсона между морфологическими характеристиками самцов и характеристиками их спермы

	SL	W общая	W печени	W гонад
Год	0,28 p=0,057	0,39 p=0,007	0,13 p=0,393	-0,14 p=0,332
VCL	0,20 p=0,176	0,18 p=0,220	0,07 p=0,641	-0,05 p=0,753
Доля подвижных сперматозоидов	0,23 p=0,121	0,29 p=0,042	0,14 p=0,357	-0,14 p=0,359

Чтобы определить возможную взаимосвязь переменных и влияние различных факторов на характеристики подвижности сперматозоидов, мы провели анализ данных методом главных компонент – статистический метод, используемый для выявления основной структуры относительно большого набора переменных.

В анализе учитывали данные по таким характеристикам как: год, фаза нерестового сезона, средняя скорость по криволинейной дистанции, доля подвижных сперматозоидов, общий вес самцов, их общая длина, вес печени и вес их гонад.

По критерию Кайзера, значения больше единицы (Рисунок 15) имеют три фактора, они и объясняют основную дисперсию данных.

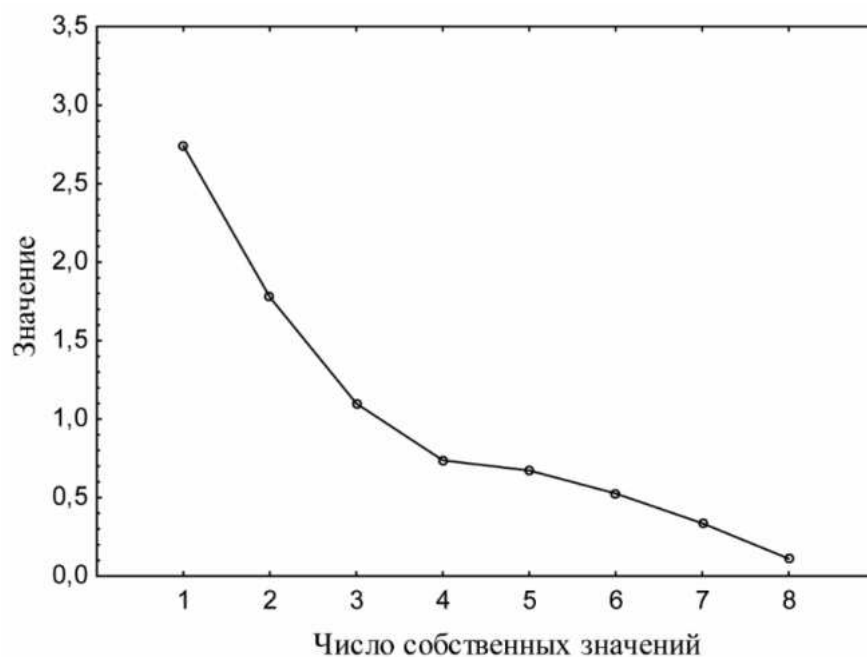


Рисунок 15 – График собственных значений главных компонент

Исходя из матрицы нагрузок (таблица 4), следует, что три выделенных фактора «объясняют» в сумме 70 % общей изменчивости переменных, выбранных для анализа. Первый фактор объясняет 32 % дисперсии, второй – 20 %, третий – 18 %. Первый фактор обуславливает размерно-весовые характеристики самцов, второй фактор объединяет характеристики подвижности спермы и год, в котором проводили исследования. Вес гонад и фаза сезона «объединяются» в третий фактор. Так же существует незначительный вклад VCL (0,37) и вклад года (0,40) в фактор 1.

Таблица 4 – Матрица нагрузок факторов

	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Год	0,40	-0,69	-0,28
Фаза сезона	-0,16	0,04	-0,81
VCL	0,37	0,68	0,00
Доля подвижных сперматозоидов	-0,09	-0,78	-0,04
SL	0,88	0,03	-0,02
W общий	0,94	0,02	0,16
W печени	0,75	0,06	0,20
W гонад	0,09	0,23	0,81
Объясненная дисперсия	2,69	1,63	1,38
Доля общего отклонения	0,32	0,20	0,18

Из матрицы нагрузок следует, что размерные и биологические характеристики (и, соответственно, возраст) самцов не оказывают существенного влияния на характеристики подвижности спермы, что согласуется с литературными данными: так для балтийского тюрбо не было выявлено корреляции между морфологическими характеристиками сперматозоидов и характеристиками самцов (длиной, объемом сцеживаемой спермы, весом семенников, гонадосоматическим индексом) [Gosz, 2010]. Для половозрелых самцов атлантического тюрбо (весом 1,4–3,2 кг) из аквакультурных питомников, также не было выявлено существенной корреляции между биологическими параметрами самцов и объемом их спермы и её подвижностью [Suquet, 1992]. Ни масса гонад, ни фаза сезона в течение исследуемого периода с середины апреля по середину июня 2008, 2012–2014 годов не влияли на характеристики подвижности сперматозоидов и объем продуцируемой спермы. Таким образом основные характеристики подвижности спермы определялись годом, в который проводили лов камбалы. Так у самцов отловленных в нерестовый сезон 2010 года было выявлено значительно более высокое качество спермы (а именно, процент подвижных сперматозоидов и VCL), чем в другие годы (2008, 2012–2014), хотя на протяжении всего периода исследования применялись одни и те же орудия лова и одни и те же процедуры оценки [Baian-dina, 2022].

Межгодовые вариации подвижности спермы самцов калкана рассмотрены на примере разных (2008, 2010, 2012–2014 гг.) нерестовых популяций калкана Севастопольского региона. Независимо от фазы и года нерестового периода активная сперма была зарегистрирована у 90 % самцов из числа «текучих» из нерестовых популяций калкана 2008, 2010, 2012–2014 г. и, в среднем, скорость сперматозоидов по криволинейной траектории составила 100 ± 52 мкм/с. Такие скорости близки к скорости VCL для близкородственного вида камбалы – тюрбо – 220 мкм/с [Cosson, 2008; Dreanno, 1999] и палтуса 150–180 мкм/с [Billard, 1977].

Доля подвижных сперматозоидов в активированных черноморской водой индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана находилась в пределах от 30 до 99 %.

Максимальная скорость отдельных сперматозоидов спермы самцов из нерестового стада за 2008, 2010, 2012–2014 гг. была зарегистрирована в 2010 г. и составила 430 мкм/с.

Концентрация сперматозоидов в сперме находилась в пределах от $4,8 \times 10^5$ до 7×10^6 сп./мкл, средняя концентрация по всем пробам $1,5 \times 10^6$ сп./мкл за все года.

РАЗДЕЛ 4. РАЗВИТИЕ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК КАЛКАНА

4.1. Оценка качества эмбрионов и ранних личинок камбалы калкана

Оценка симметрии деления клеток на ранних стадиях (бластомера) является хорошим индикатором состояния (качества) икры камбалы калкан. У калкана наблюдали зависимость между правильностью деления бластомеров и последующей выживаемостью эмбрионов и личинок во время раннего онтогенеза. Высокая смертность эмбрионов (до 90 %) в выборках из оплодотворений, произведенных в период 03.05.07–17.05.07 была связана преимущественно с остановкой развития эмбрионов на первых этапах. В партии 03.05.07 более 50 % аномалий было обусловлено нарушениями структуры желтка: аномальной дефрагментацией клеточного материала и желтка (Рисунок 16.1 и 16.2); отслоению оболочек (Рисунок 16.3) и образованию аномальных полостей между мембранами (Рисунок 16.4), отсутствию мембран между делящимся клеточным материалом и образование вакуолей (Рисунок 16.5), которые приводили к раннему апоптозу зародыша. Остальные эмбрионы этих партий погибали до завершения гастрюляции.

Наибольшая смертность эмбрионов из партии 17.05.07 приходилась на первый и второй этап. На первом наблюдали асинхронность дробления бластомеров и большое количество аномальных делений в конце этапа дробления, до начала этапа эпителиальной бластулы. На протяжении стадии дробления встречали следующие аномалии: асимметричное положение бластомеров и различные размеры бластомеров, их частичное отделение в процессе деления (Рисунок 16.7), нарушение межклеточной адгезии бластомеров, приводящее к образованию аномальных шарообразных бластомеров (Рисунок 16.8–9), и, в дальнейшем, к пролиферации клеток

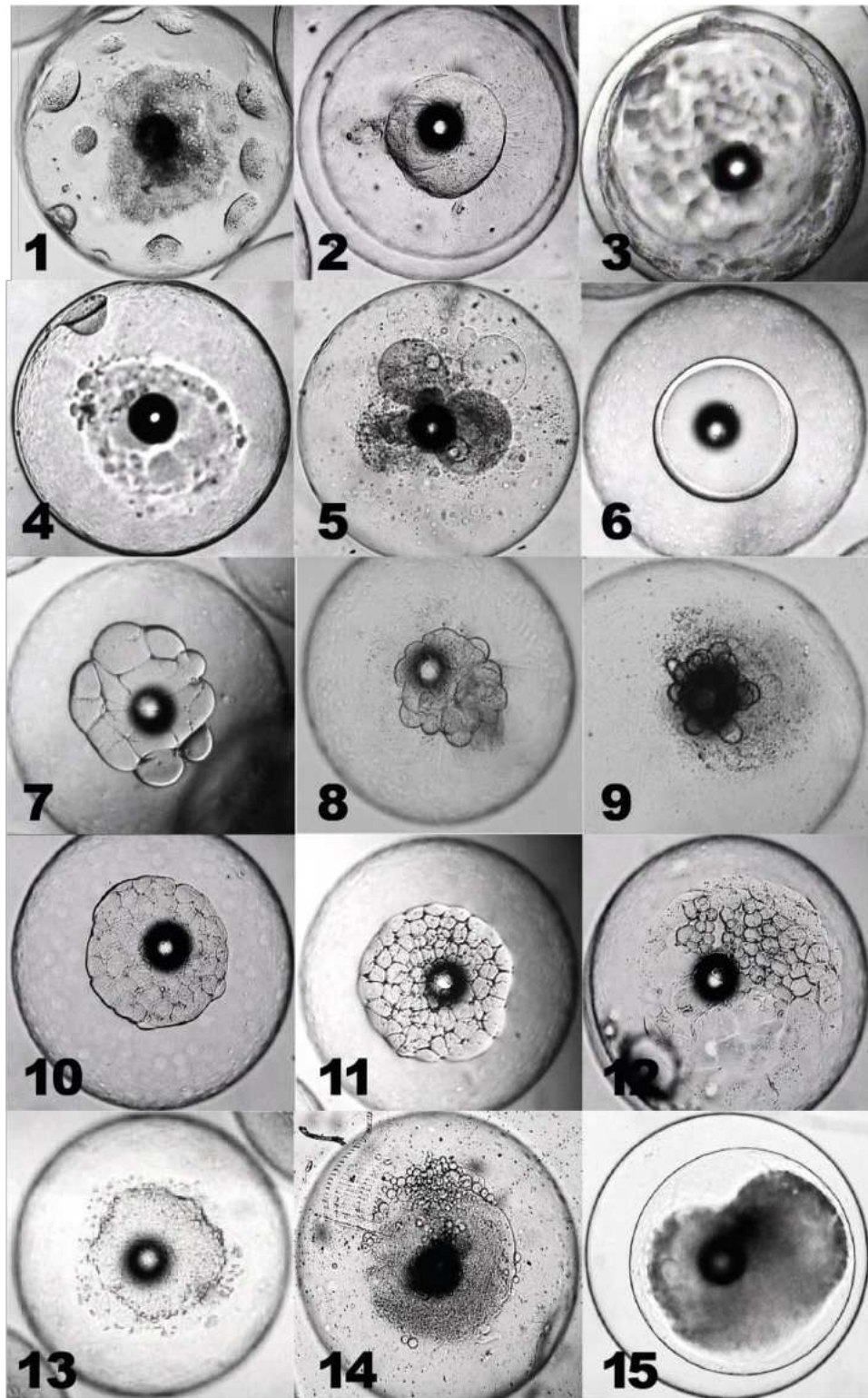


Рисунок 16 – Норма и аномалии развития эмбрионов камбалы калкан на ранних стадиях эмбриогенеза. 1–2 нарушения структуры желтка: аномальной дефрагментацией клеточного материала и желтка; 3 отслоению оболочек; 4 образование аномальных полостей между мембранами; 5 отсутствие мембран между делящимся клеточным материалом и образование вакуолей; 6 норма развития: об-

разование бластодиска; 7 асимметричное положение и различные размеры бластомеров, их частичное отделение в процессе деления; 8–9 нарушение межклеточной адгезии бластомеров, приводящее к образованию аномальных шарообразных бластомеров; 10–11 норма развития на стадии 64–128 бластомеров: делящиеся клетки зародыша калкана образуют компактную группу клеток с высокой степенью адгезии; 12 нарушения синхронности деления и адгезии клеток: разделения мембран крупных и мелких бластомеров и пролиферация бластомеров, образование вакуолей в мембранных структурах и цитоплазме; 13 норма развития на стадии > 512 бластомеров, ряды синцитиальных ядер перибласта видны только по периферии компактного бластодиска; 14 нарушения деления и адгезии клеток и на стадии эпителиальной бластулы; 15 апоптоз зародыша

Нарушения симметричного деления наблюдаются как на стадии дробления, так и непосредственно перед стадией эпителиальной бластулы, когда, сначала у части крайних бластомеров, не наступает следующего деления (Рисунок 16.11). Более серьезные нарушения синхронности деления и адгезии клеток непосредственно перед эпителиальной бластулой приводят к полному разделению мембран крупных и мелких бластомеров, к пролиферации бластомеров, образованию вакуолей в мембранных структурах и цитоплазме (Рисунок 16.12). Аналогичные нарушения деления и адгезии клеток наблюдали и на стадии эпителиальной бластулы (Рисунок 16.14). Морфологические аномалии в делящихся клетках приводят к нарушениям дальнейшего развития эмбрионов. Плавучесть икры с аномалиями на I и II этапах, приводящих к полному апоптозу зародышей (Рисунок 16.15), изменялась в процессе апоптоза зародыша, и она оседала в течение 24 часов после оплодотворения.

Оценка симметрии деления клеток на I и II этапе является хорошим индикатором качества икры морских рыб [Shields, 1997]. Известно, что первые деления клеток регулируются исключительно материнским геномом. В случае, если по каким-либо причинам геном эмбриона не активизируется, клетки бластодиска не дифференцируются на два слоя и эмбрион погибает.

У половины всех эмбрионов калкана, полученных при оплодотворениях 03.05.07, и у четверти при оплодотворении 17.05.07, смертность была связана с остановкой развития икры до начала действия собственного генома зародыша.

Нарушения развития калкана на стадии гастрюляции были связаны с дезорганизацией клеток во время формирования зародышевого кольца и остановкой развития зародыша в процессе обрастания желточного мешка. Нарушения деления клеток в разных тканях в процессе органогенеза приводили к формированию аномального бесформенного эмбриона, или искривлению оси тела зародыша.

Наиболее высокая доля выживаемости как на ранних этапах эмбриогенеза, так и на более поздних была получена при оплодотворении, произведенном 23.05.07. Для разных групп зародышей калкана, полученных из икры одной самки, оплодотворенной двумя самцами, выживаемость составляла 10 и 20 %. Наибольшее количество разнообразных аномалий развития у эмбрионов из этих партий наблюдали на IV этапе развития. Были обнаружены следующие аномалии: остановка развития головного отдела, редукция желтка до размера жировой капли и редуцированные размеры зародыша, обрастание относительно нормально развивающимся зародышем сжатого желтка и образованием большого пространства между оболочкой икры и перибластом (Рисунок 17.1–2); аномальное формирование тканей переднего отдела и образование пузырчатых структур в заднем отделе тела (Рисунок 17.3).

В партиях более поздних оплодотворений калкана преобладали аномалии развития зародыша на V этапе. Часто они заключались в аномалиях формирования хвостового отдела, которые, по-видимому, являлись следствием отдельных нарушений структуры делящихся клеток на IV этапе (Рисунок 17.6).

Часть аномалий, не препятствовавших выклеву зародыша, проявлялась после выклева. Так, в одной из партий 23.05.07 (от икры, оплодотворенной самцом SL = 33,9 см), 10 % выклева, было обнаружено около 10 % личинок с редуцированным желточным мешком (Рисунок 17.10).

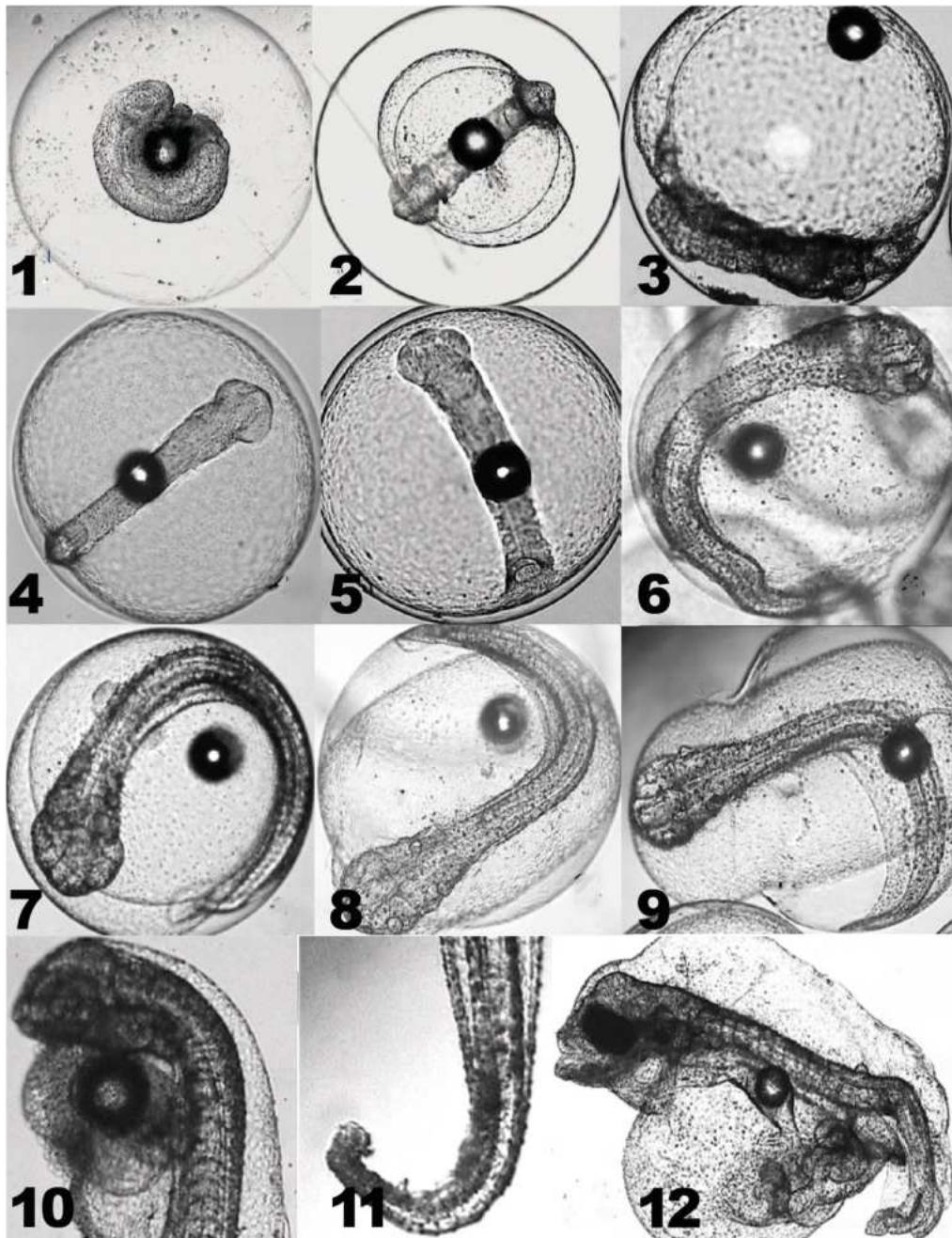


Рисунок 17 – Норма и аномалии развития калкана на поздних стадиях эмбриогенеза и ранних стадиях личиночного развития: 1 остановка развития головного отдела, редукция желтка до размера жировой капли и редуцированные размеры зародыша; 2 образование большого пространства между оболочкой икри и перибластом; 3 аномальное формирование тканей переднего отдела и образование пузырчатых структур в заднем отделе тела; 4–5 норма развития эмбрионов на IV–V этапе, 6 аномалии формирования хвостового отдела, 7 норма развития эмбрионов на VI этапе, 8–9 выклев, 10 личинка с редуцированным желточным мешком, 11 личинка с незначительным искривлением хвостового отдела, 12 «двойной

зародыш» развитие двух неравномерно развитых особей, сросшихся на уровне передней части хвостового отдела, имеющих общий желтковый мешок и отдельные жировые капли.

Личинки с минимальными искривлениями хвостового отдела (Рисунок 17.11) доживали до стадии перехода на внешнее питание, но переходили к питанию редко и выживаемость их на стадии экзогенного питания была равна нулю.

В выборке, полученной из икры, оплодотворенной 7.05.07, выживаемость личинок до стадии выклева составила менее 0,01 %, выклев задерживался на 10–12 час, и у всех выклюнувшихся личинок были обнаружены редкие аномалии: в одной икринке происходило развитие двух неравномерно развитых особей, сросшихся на уровне передней части хвостового отдела, имевших общий желтковый мешок, но отдельные жировые капли (Рисунок 17.12), которые доживали только до стадии перехода на внешнее питание. Подобные аномалии относят к «двойным зародышам». Ранее были описаны «двойные зародыши» личинок калкана, полученные от диких производителей в мае 1983 г. [Битюкова, Ткаченко, 1986], но они были симметрично развитыми особями: «сиамскими близнецами», сросшимися на уровне слуховых капсул, в области грудных позвонков или каудального отдела позвоночника.

Другие аномалии личинок состояли в появлении водяночных полостей, в околосоердечной сумке, желточном мешке и брюшной полости, имевшими происхождение на более ранних этапах развития.

По-видимому, степень аномалий эмбрионов калкана связана с нарушениями мембранного комплекса развивающейся икры. На стадии бластулы встречаются следующие аномалии: асимметричное положение blastomeres, различный размер blastomeres, неполная межклеточная адгезия blastomeres, неполное разделение клеточных матриксов, вакуолярные межклеточные включения. На ранних и более поздних этапах эмбриогенеза нарушения гомеостаза зародыша совпадает с нарушениями структуры многослойной *zona radiata* [Ханайченко, 2019].

Большая часть аномалий эмбрионов, возможно, связана с нарушениями ионного метаболизма, который регулируется через трансмембранную передачу

ионов кальция. Изменения ионного баланса кальция может вызывать изменение общего ионного баланса эмбриона и приводить к накачиванию воды и ее перераспределению в желтке, бластомерах и в межклеточном пространстве. Повышение содержания связанного кальция приводит к изменениям ионного баланса, адгезивных свойств клетки и, как результат, к диссоциации бластодермы на отдельные бластомеры. Гипертонический стресс (в результате дефицита ионов Ca^{2+}) приводит к нарушениям в строении кортикального слоя мембран [Zhang, 2000], которые были обнаружены у многих аномальных эмбрионов калкана.

Наиболее распространенным дефектом на ранних этапах развития оказалась асимметрия бластомеров. Другие аномалии, такие как полное разделение бластомеров, обнаружены только в отдельных экспериментальных партиях. Процент аномальных бластомеров на стадии дробления влиял на процент выклева личинок.

На стадии гастрюляции аномалии выражались в замедлении процесса эпиболлии и неполном обрастании желтка клеточным материалом. Аномалии на этапе органогенеза часто были связаны с искривлением тела в разных плоскостях, обусловленных искривлением хорды. Личинки могли выклевываться, но большая их часть погибала до стадии перехода на внешнее питание.

Большая часть зафиксированных нами отклонений развития в период раннего онтогенеза калкана (потомства, полученного от производителей нерестового стада калкана в районе Севастополя в 2007 г.) сходна с обнаруженными отклонениями в развитии эмбрионов трески из ихтиопланктонных сборов у северного побережья Норвегии [Makhotin, Solemdal, 2001]. Авторы также обнаруживали большое количество аномалий эмбрионов трески в начале ее нерестового сезона.

Процент аномалий на ранних стадиях развития снижался от начала к середине сезона. Относительный процент аномалий более позднего развития, по предварительным данным, возрастал к концу нерестового сезона.

4.2. Влияние родительского «фактора» на качество и выживаемость икры и личинок калкана

Вклад родительского «фактора» (материнского и отцовского) определяют по проценту успешного оплодотворения, размерным показателям икры и личинок при различных скрещиваниях, нормам развития эмбрионов и личинок рыб [Chambers, 1996; Rideout, 2005; Kroll, 2013].

По итогам экспериментов развития икры в ходе нерестовых сезонов 2007 и 2009 г. для определения влияния родительского фактора на качество икры были рассчитаны коэффициенты вариабельности для таких показателей как: диаметр овулировавшей икры (CV D), диаметр жировой капли (CV OD) (таблица 5), длина личинки на выклеве (CV SL), диаметр жировой капли личинки (CV OD личинки), желточный мешок (CV VYS) (таблица 6)

Таблица 5 – Вариабельность размеров икры

Дата оплодотворения	Самец	Самка	Скрещивание	D, мкм	CV D, %	OD, мкм	CV OD, %
23.05.07	3(2007)	1(2007)	А	1290	1,8	215	2
23.05.07	4(2007)	1(2007)	Б	1290	1,8	215	2
20.04.09	2	1	1	1230	5,0	209	6,5
20.04.09	4	3	2	1260	2,0	216	5,3
20.04.09	19	20	3	1325	1,9	217	3,0
15.05.09	143	142	4	1290	2,3	226	1,2
15.05.09	144	142	5	1290	2,3	226	1,2
29.05.09	237	257	6	1260	3,2	217	5,2

Таблица 6 – Вариабельность размеров личинок на выклеве

Дата оплодотворения	Температура инкубации	Скрещивание	Процент выклева %	SL, мкм	CV SL,%	VYS,%	CV VYS %	OD, мкм	CV OD,%
23.05.07	16	А	75	2910	1,9	0,47	42	200	2,5
	16	Б	35	2920	1,9	0,40	29	199	1,7
20.04.09	15	1	17	2875	7,2	0,58	31	210	6,8
	15	2	24	3054	5,1	0,45	12	220	5,8
	15	3	14	3050	2,3	0,35	9	220	4,0
	18	1	4	–	–	–	–	–	–
	18	2	1	–	–	–	–	–	–
	18	3	0	–	–	–	–	–	–
15.05.09	15	4	37	2405	3,0	1,02	1	230	4,8
	15	5	11	–	–	–	–	–	–
	18	4	39	3180	2,6	0,57	11	220	4,8
	18	5	16	–	–	–	–	–	–
	21	4	22	3200	3,8	0,37	22	220	5,3
	21	5	6	–	–	–	–	–	–
29.05.09	15	6	36	2670	2,8	0,52	13	215	6,0
	18	6	24	2850	3,8	0,56	13	200	4,0
	20	6	6	2730	2,3	0,50	12	200	5,5

По нашим данным, для каждой самки калкана средний индивидуальный CV диаметра овулировавших икринок за сезон 2009 г находился в пределах от 1,2 до 5. Причем вариабельность размеров икры, полученной в различные фазы нерестового сезона была различна: CV диаметра икры от 5 % до 1,9 %, длины личинок от 2,3 % до 7,2 в начале сезона, CVD икры 2,3 и CVSL личинок от 2,6 до 3,8 в середине, и CVD икры 3,2 и CVSL личинок 2,3 до 3,8 в конце сезона. Соответственно менялся и процент выклева для оптимальных температур фазы нерестового сезона в среднем 17 % – 25 % – 37 %

В экспериментах с инкубированием икры и личинок от 1 и 2 оплодотворения разброс значений доли выживаемости при одинаковых температурах, но для разных скрещиваний, можно объяснить влиянием родительского фактора.

Наилучшую выживаемость на всех этапах эмбрионального развития при 15°C и самый большой процент выклева равный 24 % имела икра от 2-го скрещивания (в эксперименте для 1-го скрещивания процент выклева составил 17 %, для 3-го – 14 %) Из (таблицы 7) видно, что икра, использовавшаяся для оплодотворения №2, имела средний коэффициент вариабельности диаметра икринки $CVD=2,0\%$ и коэффициент вариабельности жировой капли $CVOD=5,8\%$ по сравнению с другими оплодотворениями (№1 $CVD=5\%$, $CVOD=6,5\%$ и №3 $CVD=1,9\%$, $CVOD=3,0\%$). Наименьшие показатели коэффициентов вариабельности наблюдали для икры, используемой в оплодотворении 3, для этого же скрещивания наблюдали наименьший коэффициент вариабельности длины $CVSL=2,3$ и жировой капли личинок на выклеве $CVOD=4,0$ (таблица 8). Однако, выклев личинок от 3 оплодотворения при 15 °C был минимален и равен 14 % (для 1-го оплодотворения 17 %, для 2-го 24 %).

При оплодотворении икры от одной самки (142) самцом 144 (оплодотворение №5) процент выживаемости икры был значимо ниже ($U=1$, $p=0,008$) по сравнению с результатом, полученным при скрещивании икры этой же самки с самцом 143 (оплодотворение №4) (таблица 7).

Для обнаружения зависимости вариабельности размеров выклюнувшихся личинок от вариабельности диаметра овулировавших икринок были рассчитаны коэффициенты корреляции между этими параметрами (таблица 7). $K=0,61$, $p=0,08$. Было показано, что вариабельность диаметра икринок достоверно коррелирует с вариабельностью объема желточного мешка у выклюнувшихся личинок $k=0,70$ и диаметром жировой капли $k=0,58$.

Вариабельность размеров только что овулировавших икринок рыб обычно невелика. Так, средний коэффициент вариации диаметра икринок воблы колеблется от 5,1 до 5,6, днепровской тарани средний CV 2,92, кеты – 8,1–10,4, у каспийского пузанка 2,1–3,7 [Павлов, 2008]. У камбалы этот показатель находится в пределах от 5 до 1,9 [Ханайченко, Гиригосов, 2021].

Таблица 7 – Матрица корреляций между размерными характеристиками икры и характеристиками личинок на выклеве

	SL личинок на выклеве	CV SL личинок	VYS	CV VYS	OD личинок на выклеве	CV OD личинок
D икры,	0,27 p=0,48	-0,65 p=0,06	-0,18 p=0,64	-0,72 p=0,03	0,42 p=0,26	-0,71 p=0,03
CV D икры	-0,25 p=0,52	0,61 p=0,084	0,24 p=0,53	0,73 p=0,03	-0,33 p=0,38	0,58 p=0,01
OD икры,	0,10 p=0,79	-0,57 p=0,11	0,29 p=0,44	-0,42 p=0,27	0,53 p=0,15	-0,45 p=0,22
CV OD икры	-0,19 p=0,63	0,53 p=0,14	-0,24 p=0,54	0,44 p=0,27	-0,62 p=0,08	0,51 p=0,17

Из таблицы 7 и таблицы 8 видно, что вариабельность диаметра икры в среднем в 1,5 раза меньше вариабельности длины личинок выклюнувшихся из этой икры, а вариабельность жировой капли остается в тех же пределах. Такая закономерность наблюдалась для икры и личинок османа и форели.

Была установлена достоверная отрицательная корреляции между коэффициентом вариации диаметра икринок и процентом выклева ($k = -0,44$, $p = 0,05$) (таблица 8). Вариабельность размерных признаков находилась в зависимости от качества родительских гамет. Было показано, что диаметр икры изменялся в зависимости от родительского фактора ($k = 0,61$, $p = 0,01$) и фазы нерестового сезона.

Была обнаружена корреляция между коэффициентом вариации стандартной длины личинок на выклеве и родительским фактором ($k=0,70$, $p=0,04$) (таблица 9). Коэффициенты вариации между размерными характеристиками личинок и других факторов били недостоверны.

Таблица 8 – Матрица корреляций между размерными характеристиками икры и комплексом факторов

	Диаметр икры	CV D икры	OD икры, мкм	SV OD икры	Доля выклева %
Фаза нерестового сезона	0,08 p=0,76	0,21 p=0,44	0,53 p=0,03	0,36 p=0,17	0,47 p=0,07
Скрещивание	0,38 p=0,142	0,49 p=0,06	0,61 p=0,01	0,49 p=0,06	0,34 p=0,20
Температура	0,03 p=0,92	-0,05 p=0,86	0,20 p=0,45	-0,18 p=,52	-0,38 p=0,14
Доля выклева %	-0,05 p=0,84	-0,44 p=0,05	0,38 p=0,15	-0,23 p=0,39	

Таблица 9 – Матрица корреляций между размерными характеристиками личинок и комплексом факторов

	SI личинок	CV SL личинок	VYS	CV VYS	OD личинок	CV OD личинок
Фаза нерестового сезона	-0,38 p=0,30	0,54 p=0,13	0,21 p=0,60	0,13 p=0,74	-0,42 p=0,26	0,22 p=0,57
Скрещивание	-0,34 p=0,37	0,70 p=0,04	0,05 p=0,90	0,33 p=0,39	0,46 p=0,22	0,39 p=0,30
Температура	0,36 p=0,35	0,28 p=0,47	0,30 p=0,42	0,30 p=0,42	0,43 p=0,25	-0,20 p=0,62

Разнокачественность личинок находит свое выражение и в разных размерах вылупившихся личинок, и в разной обеспеченности их желтком.

Влияние «отцовского» фактора рассмотрено на примере развития эмбрионов, полученных в нерестовом сезоне 2007 г. при одновременном оплодотворении икры от одной самки (SL = 42,2 см) спермой разных, но одновозрастных самцов из одной нерестовой группы (23.05.07): SL = 37,6 см (скрещивание А) и SL = 33,9 см (скрещивание Б). Во время эмбрионального развития «отцовский» эффект выражался в различиях форме и количестве аномалий развития на разных стадиях эмбриогенеза между «сводными» группами полу-сибсов. Процент оплодотворения икры спермой варьировал от 75 % до 35 % между двумя группами (А и Б, со-

ответственно). К стадии перехода на внешнее питание, выживаемость личинок группы полу-сибсов А составила 40 %, а Б – 20 % от начального количества нормально оплодотворенной икры (результаты по трем повторностям каждой группы).

Обнаружены различия между размерами личинок, полученных от разных самцов. При вылуплении личинки имели одинаковые размеры тела, различия в характеристиках личинок из групп А и Б заключались в разной скорости роста за счет запасов желточного мешка на стадии экзогенного питания и в разных длинах на стадии перехода на внешнее питание (Рисунок 18).

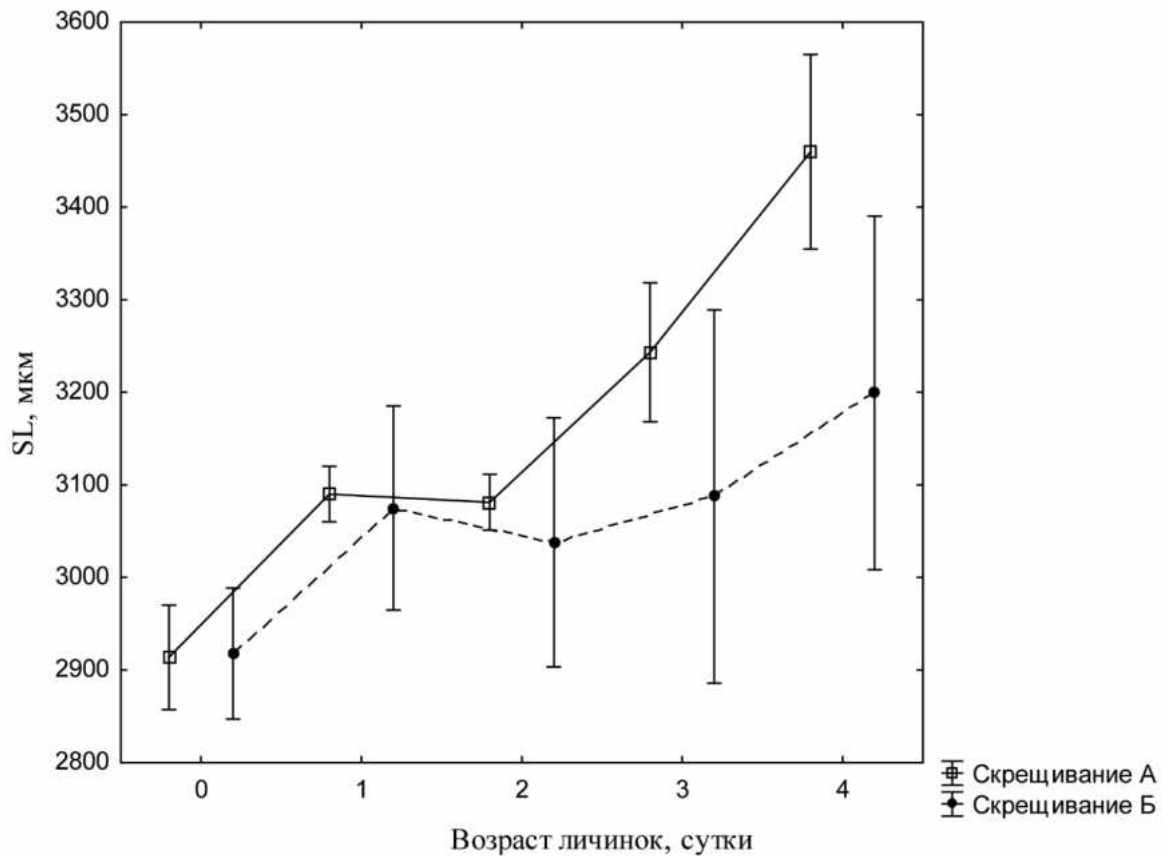


Рисунок 18 – Изменение стандартной длины (SL, мкм) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питания для двух скрещиваний икры от одной самки спермой разных самцов (партия от 23.05.07) (\square скрещивание А, \bullet скрещивание Б)

На выклеве стандартная длина (SL) отличалась незначимо между группами полу-сибсов ($U = 182,5$, $p = 0,49$): для совокупной выборки А составляла $SL=2910$

± 20 мкм и для совокупной выборки Б – $SL = 2920 \pm 70$ мкм, при объеме желточного мешка личинок $0,47 \pm 0,17$ и $0,4 \pm 0,08 \times 10^9$ мкм³, соответственно, и практически одинаковых для диаметрах жировой капли (200 ± 5 и $199 \pm 3,5$ мкм). Через сутки после выклева длина личинок тех же выборок составила 3090 ± 30 и 3080 ± 40 мкм, соответственно. На четвертые сутки после выклева, перед переходом на внешнее питание, у тех же выборок личинок стандартная длина достоверно различалась ($U = 183,5$, $p = 0,0001$), составляя 3460 ± 30 и 3200 ± 60 мкм, соответственно. Таким образом, различия между выборками потомков от разных самцов (влияние «отцовского» эффекта на развитие в раннем онтогенезе) заключались в более низком проценте правильно оплодотворенной икры, в стандартной длине, в большей вариабельности стандартной длины личинок на выклеве в группе Б по сравнению с группой А. Перед переходом на внешнее питание средняя стандартная длина личинок группы Б была значительно меньше, а вариабельность их длины на этой стадии значительно выше, чем у группы А. Использование запасов желточного мешка на рост от момента выклева до перехода на внешнее питание, важного параметра для повышения выживаемости личинок в раннем онтогенезе [Битюкова, 1986], было значимо выше у личинок группы А.

Таким образом, вариация размеров выклюнувшихся личинок, определялась качеством половых продуктов, использованных при скрещивании. Низкий коэффициент вариабельности размеров икринок калкана от одного скрещивания является одним из важных параметров качества икры. Возможно, что аномалии I этапа эмбриогенеза и выживаемость эмбрионов связаны с «материнским» эффектом, т.е. с состоянием запасных веществ и/или мРНК яйцеклеток [Ottesen, 2007]. Но более поздние нарушения развития и высокую смертность, по-видимому, можно отнести к комбинированному воздействию «материнского» и «отцовского» фактора, так как на этих стадиях деление и дифференциация клеток и тканей уже находится под регуляцией генома зародыша.

Выживаемость личинок калкана, их успешное правильное развитие и рост до этапа перехода на экзогенное питание зависели не только от качества самой

икры, т.е. от влияния материнского фактора, но и от свойств зародыша, передаваемых по отцовской линии.

4.3. Термочувствительность икры и личинок, полученных от разных производителей в разные фазы нерестового периода

Термочувствительность эмбрионов и личинок калкана изменяется в процессе развития. Для определения различий термопреферендума эмбрионального развития в течение нерестового сезона, он был условно разделен на следующие фазы: апрель – первые числа мая – начало сезона нереста; середина - конец мая – середина сезона; июнь – конец сезона.

Начало сезона нереста.

Для икры, полученной от 3-х вариантов оплодотворений, произведенных в начале сезона размножения (20.04.09), процент выживаемости (Рисунок 19), зарегистрированный на 1-е сутки после оплодотворения был значительно выше при 15 °С и в среднем составил 90 %, чем при 18 °С. На 2е сутки – при 18 °С (этап III начало эмбриональной стадии) смертность эмбрионов (для всех партий икры) составила 90 %, при 15 °С эмбрионы находились на стадии ранней гаструлы, их смертность в среднем составила 50 %. Выклев предличинок при 15 °С произошел на 4-е сутки, в среднем выклюнулось 18 %, при 18 °С на 4 сутки вся икра погибла до начала выклева.

По-видимому, в процессе созревания ооцитов в начале репродуктивного цикла калкана, при более низких температурах воды, самки производят икру, адаптированную к более низким температурам, и, поэтому, температурный оптимум выживаемости икры сдвинут к низким температурам.

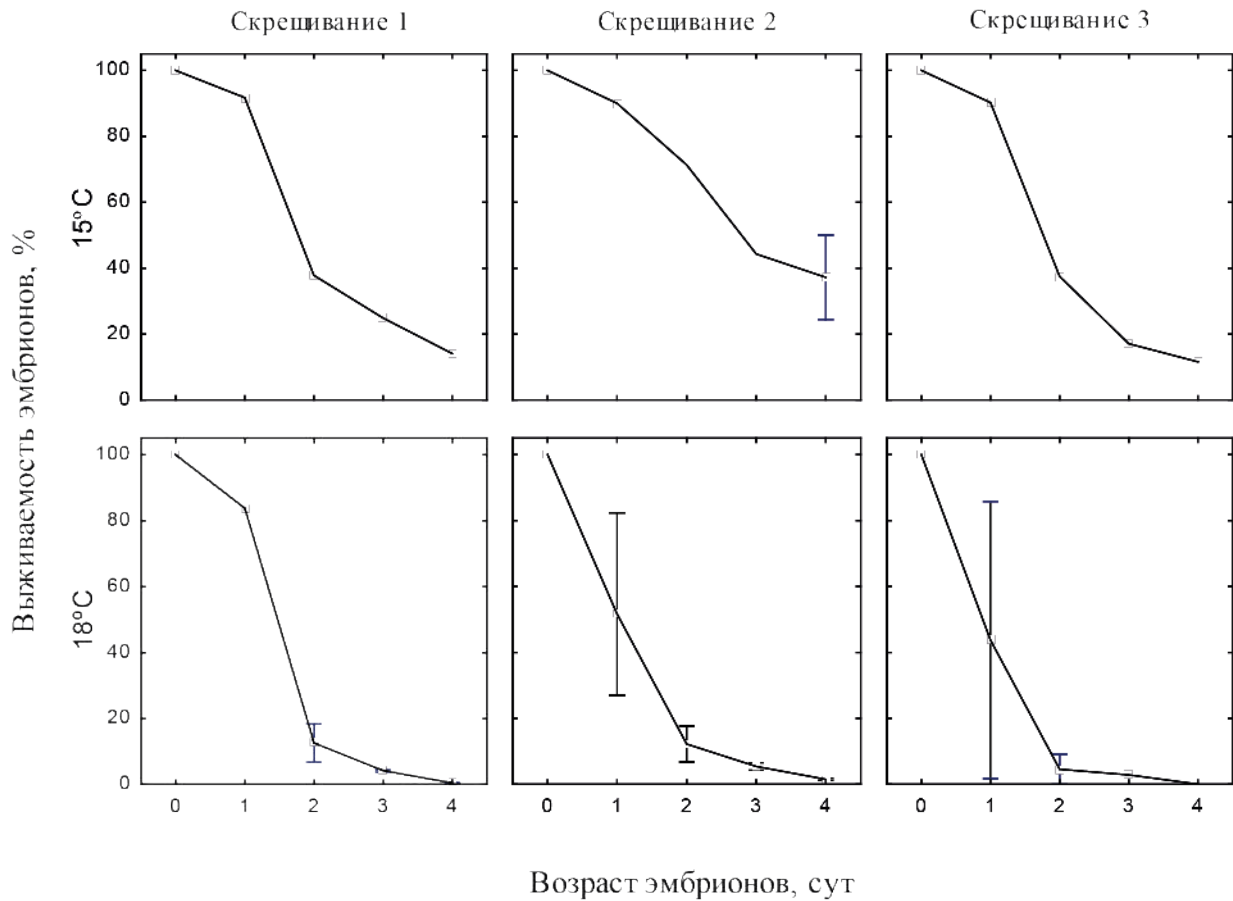


Рисунок 19 – Выживаемость эмбрионов калкана в начале сезона нереста в зависимости от температуры и отцовской наследственности (дата оплодотворения 20.04.09, скрещивания № 1–3)

Середина сезона нереста.

В экспериментах с икрой, полученной в середине сезона нереста калкана, на первые сутки процент выживаемости икры (Рисунок 19), инкубируемой при 21, 18 и 15 °C был приблизительно одинаковым и равным 70 %. На 3-е сутки процент выживаемости при 18 °C был несколько выше в 4 и 3 партиях – 54 % и 37 % соответственно, чем при 15 °C – 51 % и 25 %; и существенно ниже при 21 °C – 30 % и 10 %. Наилучший выклев наблюдали при 18°C, он составил 39 % для 4-ой партии и 16 % для 5-ой, несколько ниже выклев был при 15°C – 36 % и 11 %, а для 21 °C – 15 % и 6 % соответственно. Т.к. в середине мая температура воды в приповерхностных слоях прогревается и может достигать 18 °C [Белокопытов, 2017], по всей видимости, икра должна быть адаптирована к повышенным температурам.

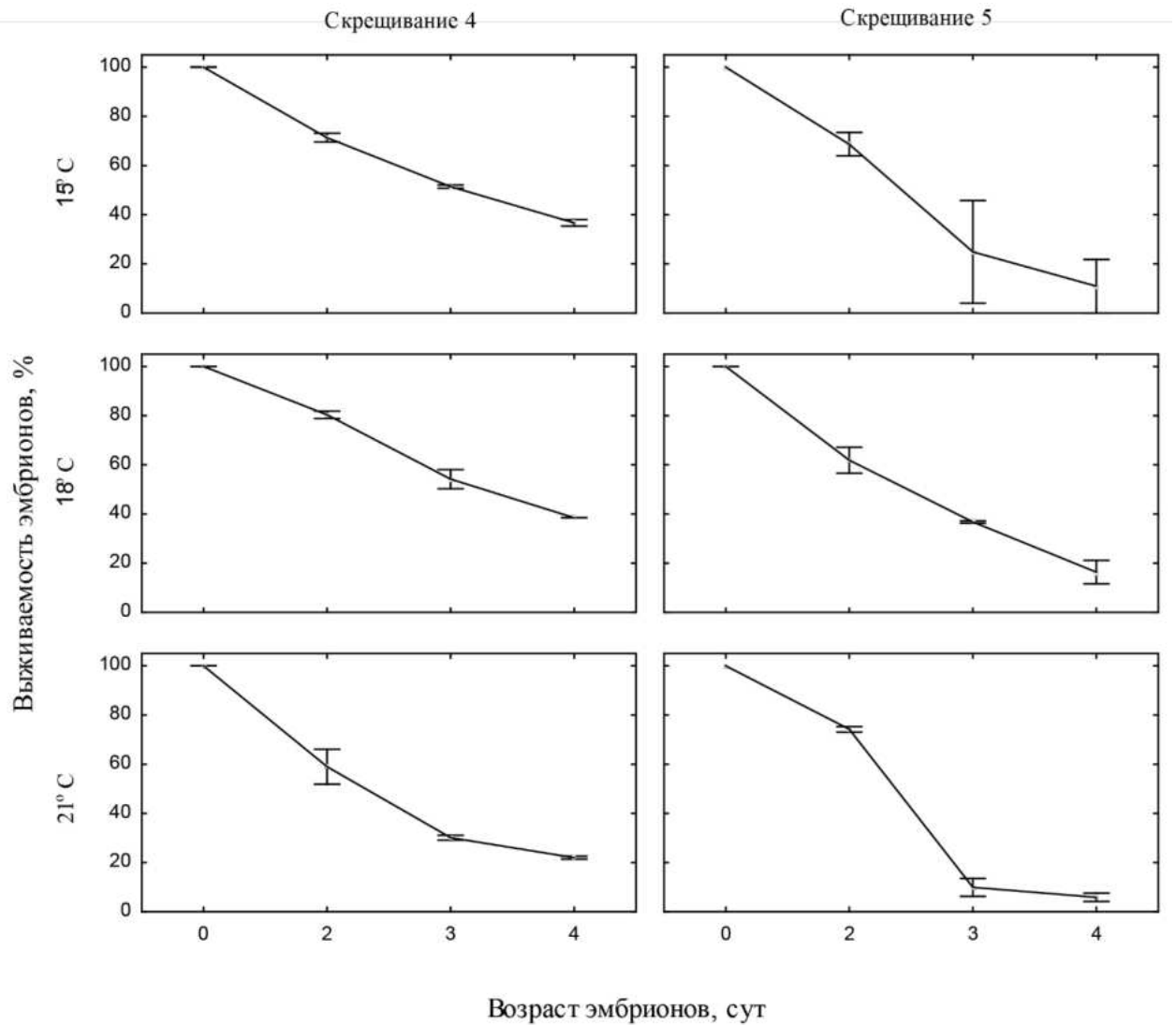


Рисунок 20 – Выживаемость эмбрионов калкана от момента оплодотворения до выклева в зависимости от температуры и отцовской наследственности (дата оплодотворения 14.05.09, скрещивания № 4–5)

Выживаемость личинок от 4-го скрещивания при 15, 18 и 21 °С (Рисунок 20) была практически одинаковой от момента выклева до перехода на внешнее питание для всех температур. Для икры 5-го скрещивания температура оказывала значительное влияние на выживаемость личинок. Наилучший процент выживаемости наблюдался при 15 °С, худший – при 21 °С. Доля выживших личинок, инкубируемых при 18°C за время от момента выклева до перехода на внешнее питание, совпадала со значениями, полученными для 4-го оплодотворения.

Т.к. для 4-го и 5-го скрещивания использовали икру от одной самки, отличия в процентах выживания между скрещиваниями (Рисунок 21) может говорить о влиянии отцовского фактора на выживаемость эмбрионов.

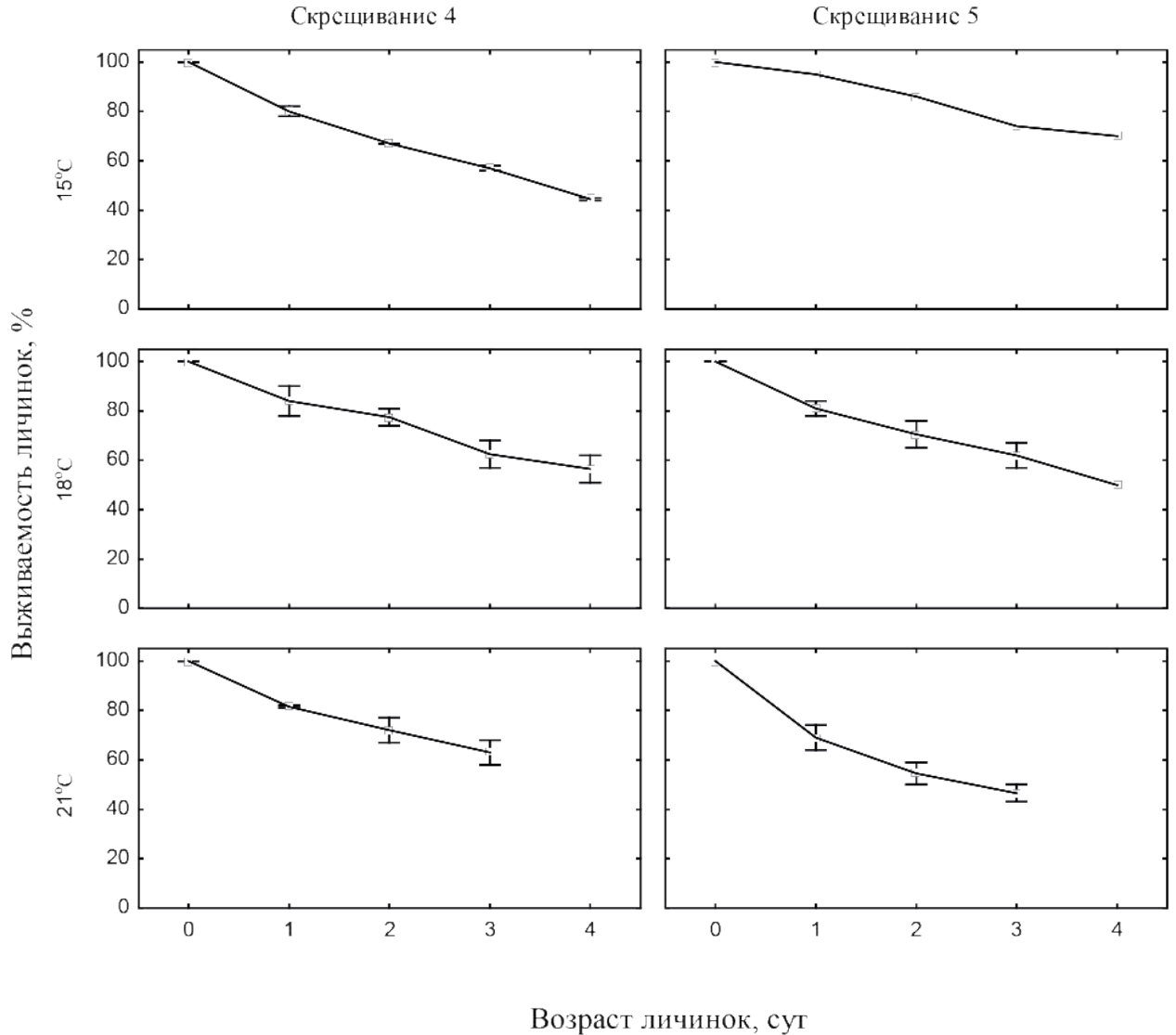


Рисунок 21 – Выживаемость личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питания, в зависимости от температуры и отцовской наследственности (партия от 14.05.09, скрещивания № 4–5)

При оценке размерных характеристик личинок (Рисунок 22) было выявлено, что при 15 °C только что выклюнувшиеся личинки имели существенно меньшую длину тела $Sl = 2400 \pm 70$ мкм, большую жировую каплю $D = 230 \pm 14$ мкм и желточный мешок $VYS = 1,02 \pm 0,4 \times 10^9$ мкм³, чем при 18°C – $SL = 3180 \pm 80$ мкм,

$D=220 \pm 10$, $VYS=0,57 \pm 0,0003 \times 10^9$ мкм³ и 21°C – $SL = 3200 \pm 120$ мкм, $D=218 \pm 12$ мкм, $YS = 0,37 \pm 0,0008 \times 10^9$ мкм³.

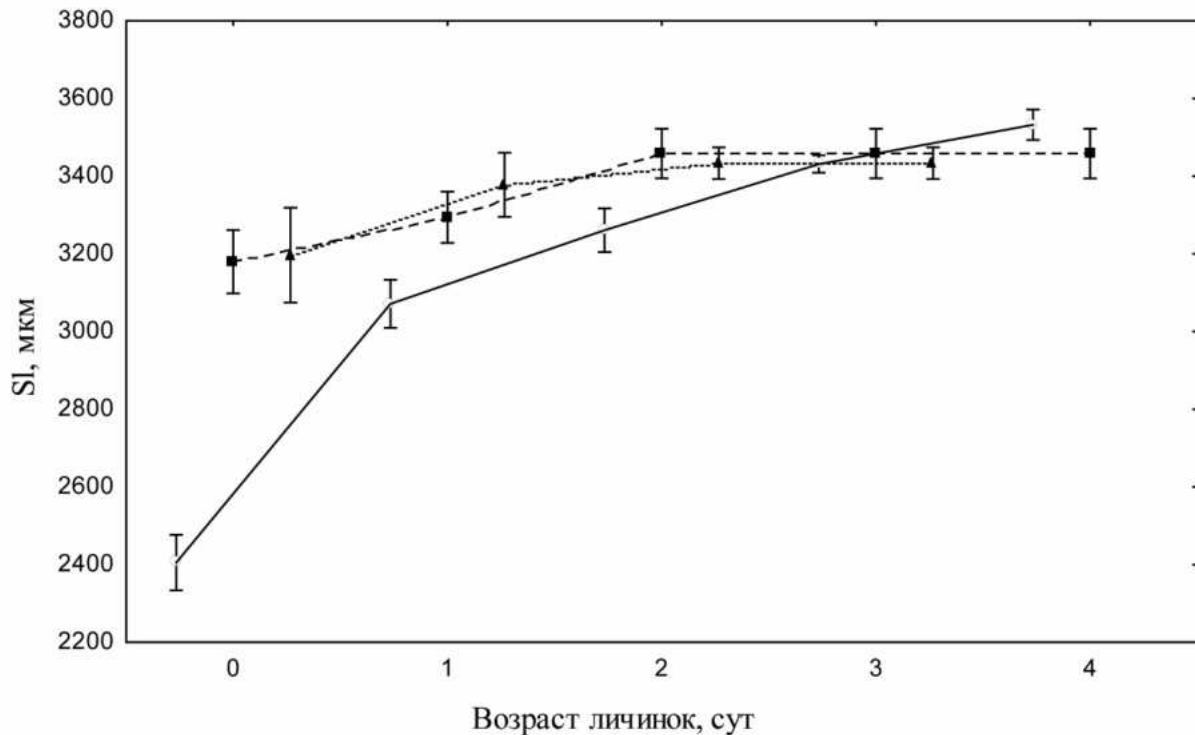


Рисунок 22 – Изменение стандартной длины (SL, мкм) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питания, в зависимости от температуры воды (партия от 14.05.09) (\circ при 15°C , \blacksquare при 18°C , \blacktriangle при 20°C)

Личинки, инкубируемые при 15°C , отставали в развитии и росте (значимо при $p \leq 0,05$) (Рисунок 22) от момента выклева до 3-х суток, по сравнению с личинками, содержащимися при 18 и 21°C . К концу 3-х суток размеры личинок, инкубируемых при 18 и 21°C , сравнялись и составили в среднем $SL = 3430 \pm 40$ мкм. В то время как личинки при 15°C обогнали их в росте $SL = 3460 \pm 50$ мкм и к моменту открытия рта имели длину тела равную $SL = 3530 \pm 35$ мкм. Резорбция желточного мешка (Рисунок 23) у личинок, содержащихся при 18 и 21°C , произошла на 2-е сутки, а при 15°C на третьи.

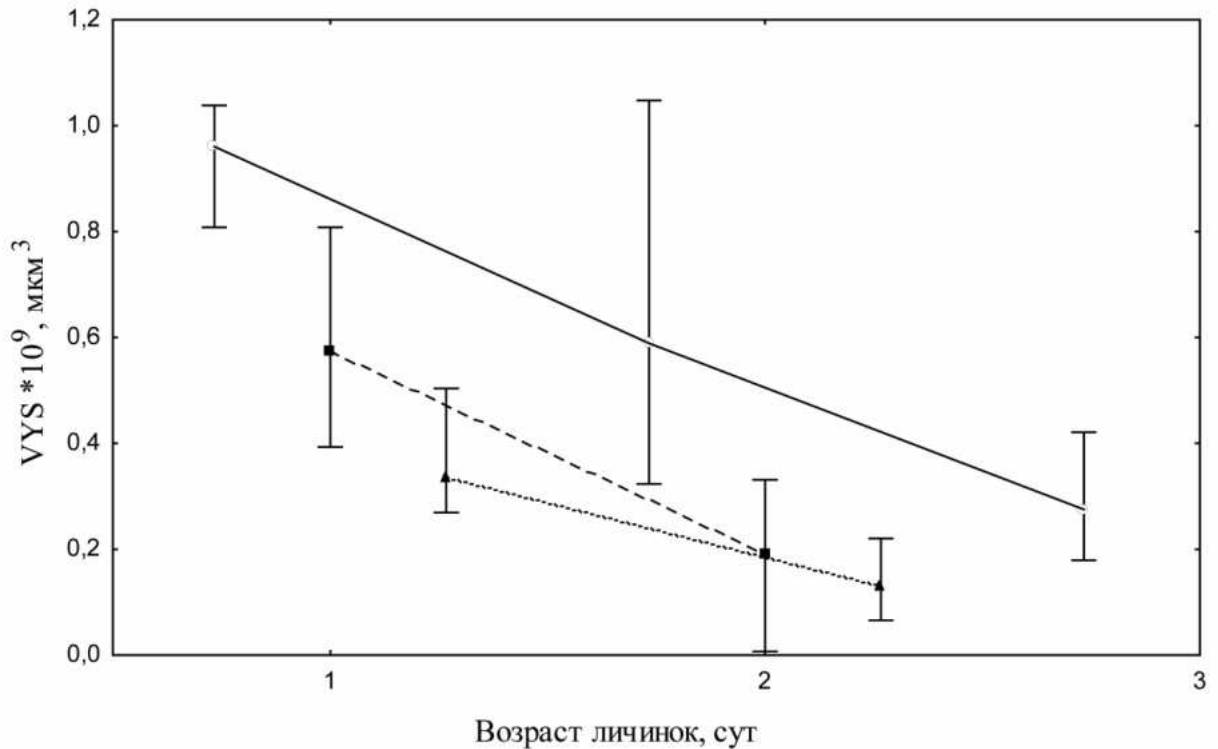


Рисунок 23 – Изменение объема желточного мешка (VYS) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры воды и (партия 14.05.09) (\blacktriangle при 15 °C, \blacksquare при 18 °C, \bullet при 20 °C)

Личинки, выращенные при 21 °C были готовы к экзогенному питанию на 3-е сутки после выклева, однако после открытия рта эти личинки не смогли перейти на внешнее питание. В то время как, личинки, инкубируемые при 15 °C и 18 °C, успешно питались уже на 5-е сутки после выклева. Таким образом, личинки, инкубируемые при 15 °C, расходовали энергетические запасы (желток и жировая капля) (Рисунок 23, Рисунок 24) медленнее и эффективнее, и к моменту полной резорбции желточного мешка имели более крупные размеры тела (Рисунок 22).

Таким образом наиболее оптимальная температура для развития эмбрионов и личинок калкана в середине сезона находится в пределах 15–18 °C. Выживаемость при температурах вне зоны оптимума, по всей видимости, зависит также от качества родительских гамет.

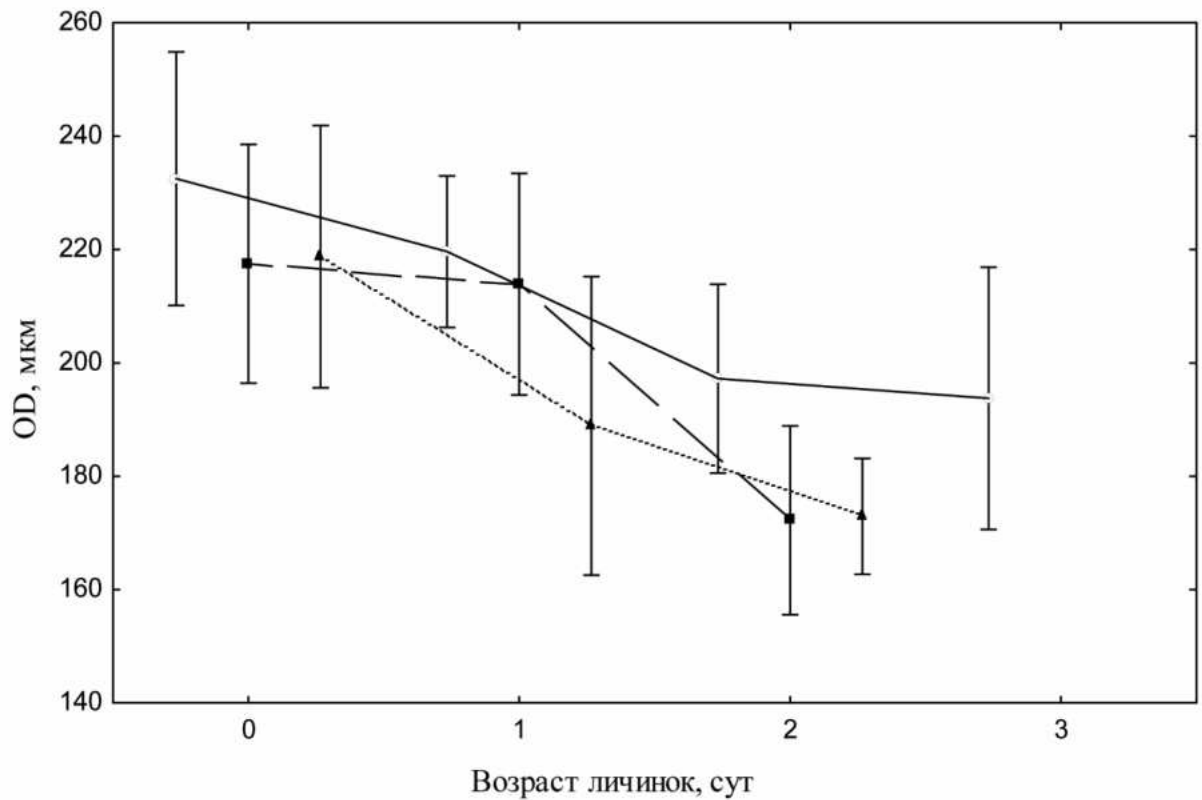


Рисунок 24 – Изменение диаметра жировой капли (OD) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры воды (партия от 14.05.09) ($\bar{\square}$ при 15 °С, \blacksquare при 18 °С, \blacktriangle при 20 °С)

Конец сезона нереста.

Для анализа влияния температуры на выживаемость икры и личинок в конце сезона, в эксперименте использовали икру, полученную от скрещивания 6. Максимально высокий отход икры (Рисунок 25) при всех температурах был зарегистрирован на вторые сутки после оплодотворения (то есть после стадии бластуляции, перед или в начале гастрюляции). Отход икры, содержащейся при 15 °С, составил 46 %, при 18 °С – 50 % и при 21 °С =14 %. Минимальный выклев в этом эксперименте наблюдали при 21 °С, выклюнулось лишь 6 % от первоначального количества икры.

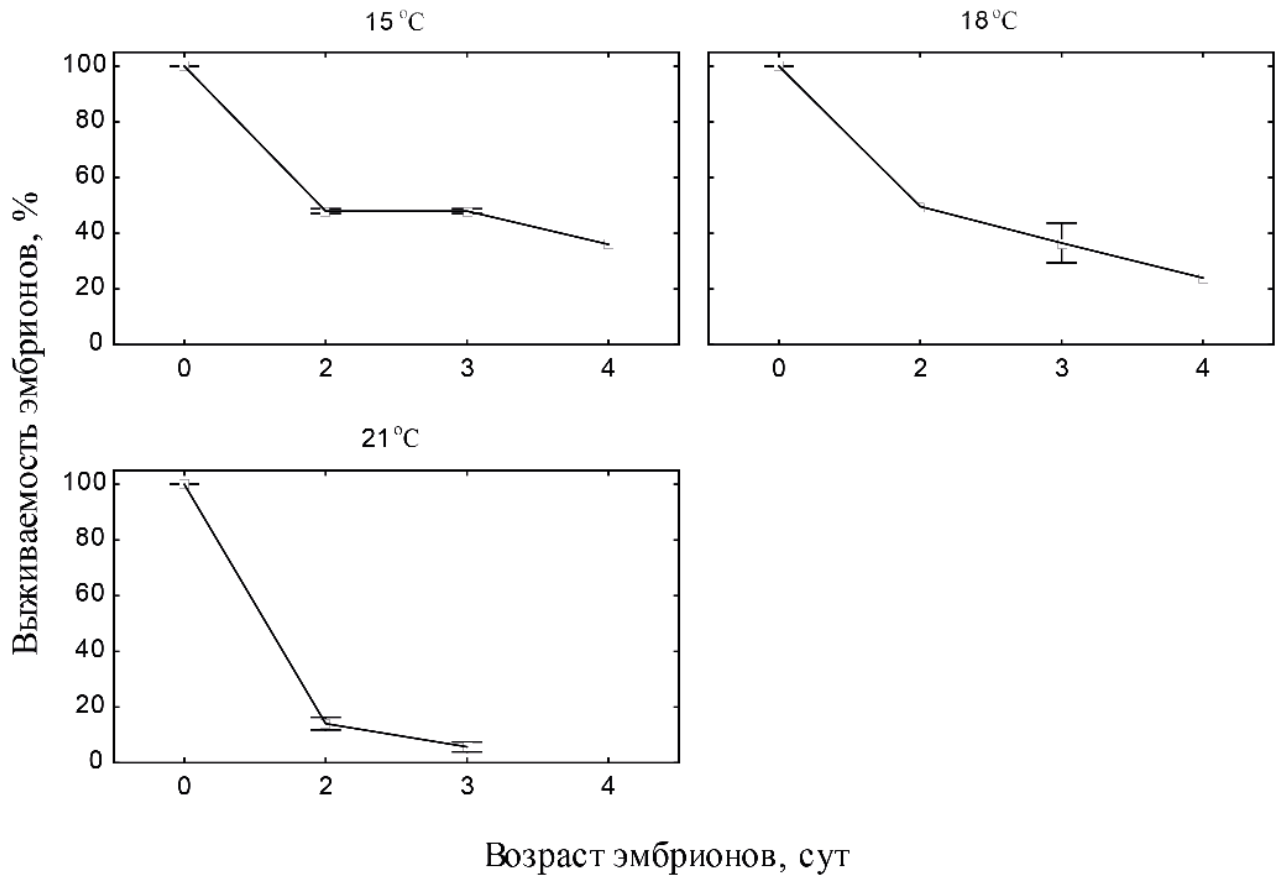


Рисунок 25 – Выживаемость эмбрионов калкана от момента оплодотворения до выклева в зависимости от температуры и отцовской наследственности (партия от 31.05.09)

На момент выклева личинки при 21 °C были слабыми, стандартная длина тела $SL = 2730 \pm 50$ мкм, $OD = 203 \pm 15$ мкм, $VYS = 0,50 \pm 0,0006 \times 10^3$ мкм³ и их смертность на вторые сутки после выклева составила 100% (Рисунок 26). Самый большой процент выклева наблюдали при 15°C (Рисунок 26), он составлял около 36 %, и выживаемость личинок ($SL = 2670 \pm 76$ мкм, $OD = 214 \pm 13$ мкм, $VYS = 0,52 \pm 0,0003 \times 10^9$ мкм³) от выклева до начала экзогенного питания в этом эксперименте так же была наилучшей (56 %) (Рисунок 26, Рисунок 27, Рисунок 28, Рисунок 29). В то время как при инкубации икры в воде с температурой 18 °C выклюнулось 24 %, на третьи сутки ($SL = 2850 \pm 108$ мкм, $OD = 200 \pm$ мкм, $VYS = 0,56 \pm 0,0007 \times 10^9$ мкм³).

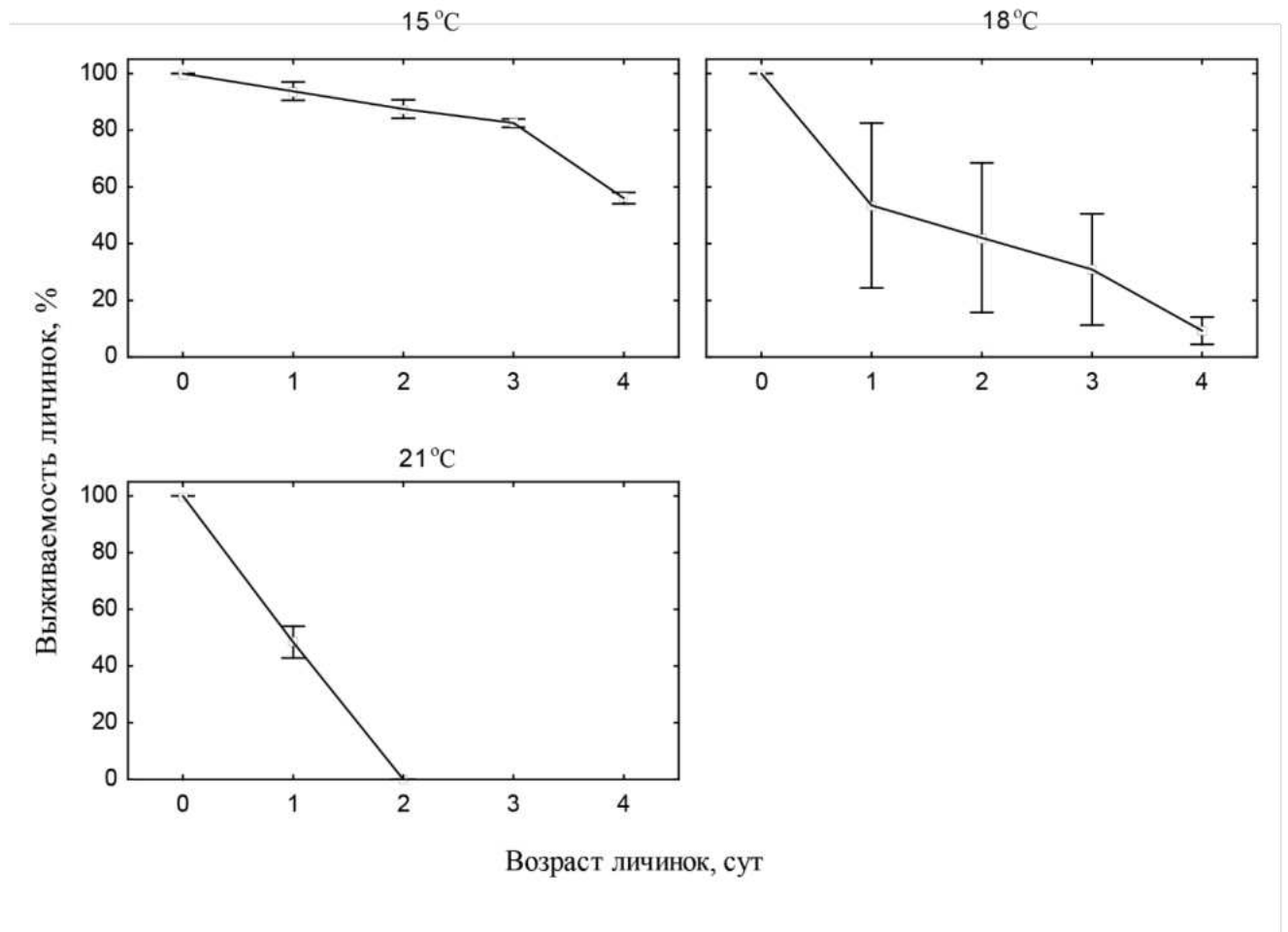


Рисунок 26 – Выживаемость личинок калкана от момента выклева до перехода на внешнее питание в зависимости от температуры (партия от 31.05.09)

К моменту перехода на экзогенное питание (Рисунок 27, Рисунок 28, Рисунок 29) на 4-е сутки личинки, содержащиеся при 15 °C, имели размеры $SL = 2980 \pm 22$ мкм, $OD = 180 \pm 12$ мкм. При 18 °C выклев произошёл на 3–4 сутки, были зарегистрированы наибольшие размеры тела личинок – $SL = 3170 \pm 50$ мкм, $OD = 160 \pm$ мкм, по сравнению с личинками, выращенными при других температурах.

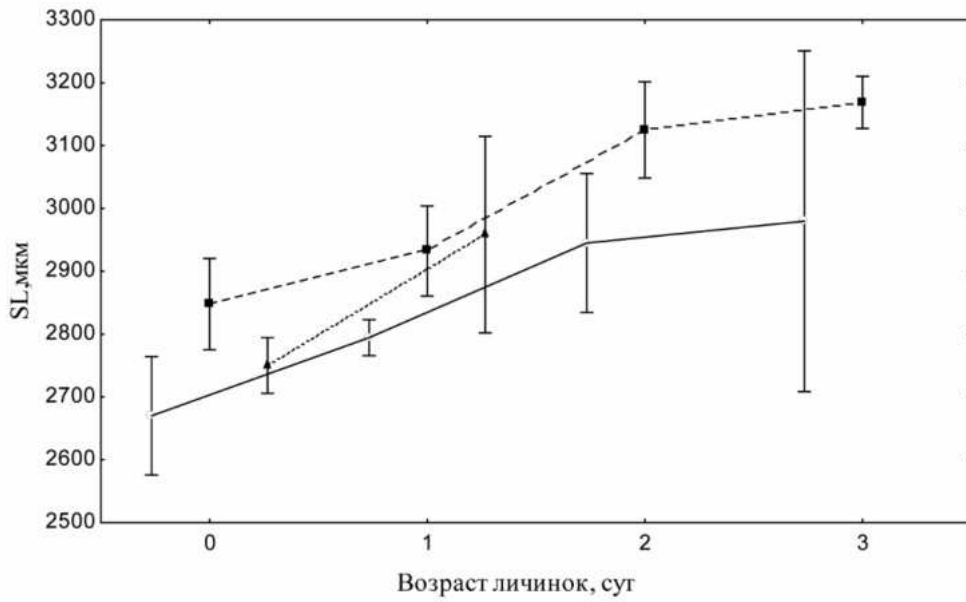


Рисунок 27 – Изменение стандартной длины (SL) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры воды (партия от 31.05.09) (○ при 15 °C, ■ при 18 °C, ▲ при 20 °C)

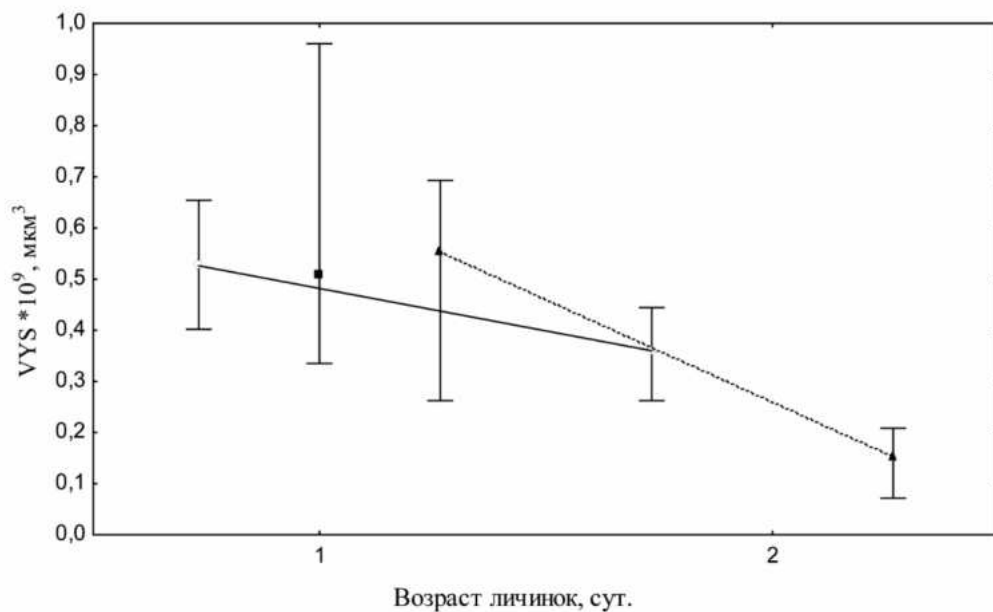


Рисунок 28 – Изменение объема желточного мешка (VYS) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры воды и (партия 14.05.09) (○ при 15 °C, ■ при 18 °C, ▲ при 20 °C)

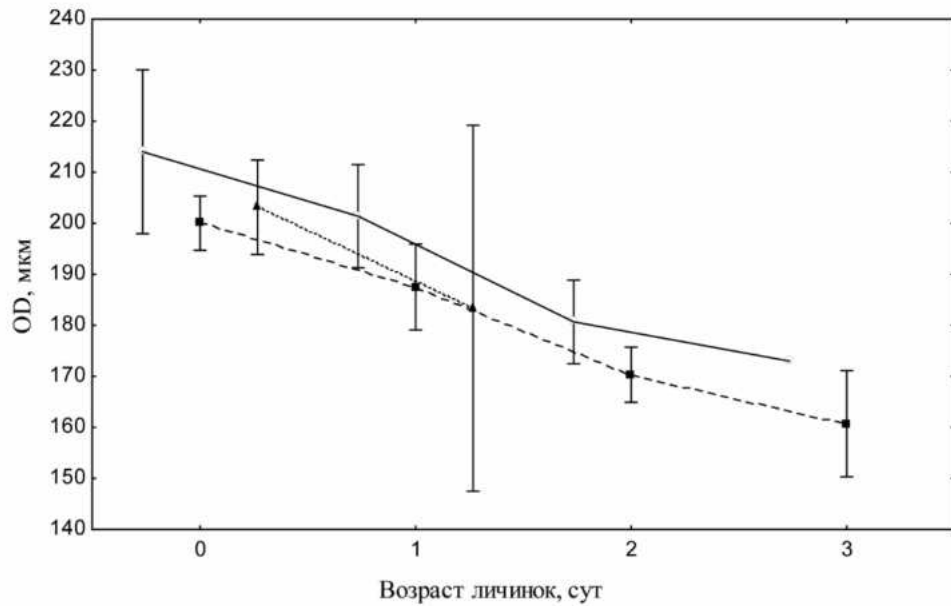


Рисунок 29 – Изменение диаметра жировой капли (OD, мкм) личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры воды и отцовской наследственности (партия от 31.05.09) (\square при 15 °C, \blacksquare при 18 °C, \blacktriangle при 20 °C)

Таким образом, можно отметить, что оптимальными для всего периода эмбриогенеза являются температуры 15–18 °C. При температуре инкубации 15–18 °C у икры с высоким уровнем оплодотворения (до 95 %) и синхронным развитием всех эмбрионов на этапе дробления, наблюдали минимальное количество аномалий на последующих этапах и максимальный выклев (Рисунок 30) личинок без видимых морфологических отклонений.

В среднем, для разных партий, длительность эмбрионального развития калкана от оплодотворения до выклева при постоянной температуре составляет около 4,5 суток – при 15 °C, 3 суток – при 18 °C и 2,5 суток при 21 °C. Для получения наибольшего процента жизнеспособных личинок наиболее целесообразно инкубировать икру в режиме повышающихся температур – от 15 °C на самых ранних этапах в начале нереста до 17–18 °C в конце.

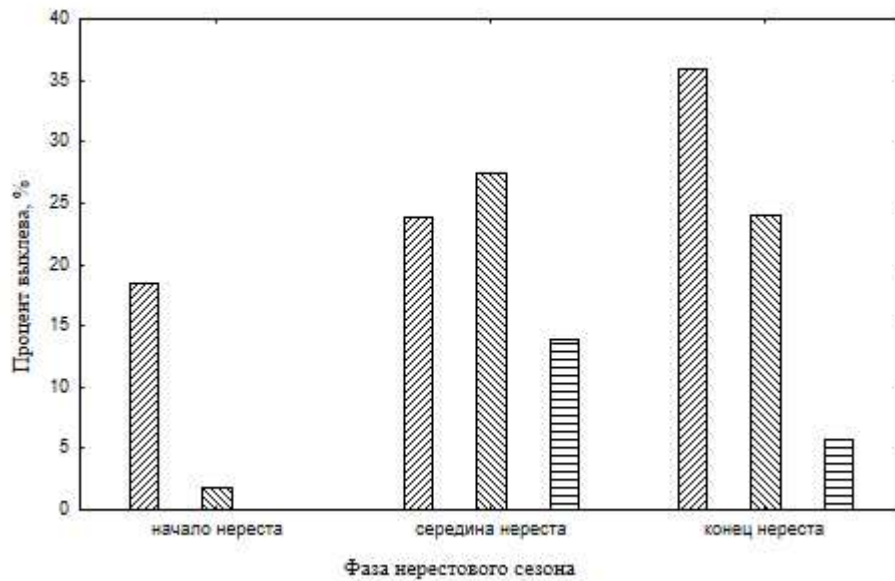


Рисунок 30 – Процент выклева эмбрионов, инкубируемых при различной температуре в разные фазы нерестового сезона (▨% выклева при 15 °С, ▩% выклева при 18 °С, ▤% выклева при 21 °С)

Термочувствительность эмбрионов, находящихся на разных этапах развития, различна. Толерантность к повышенным температурам в начале эмбриогенеза ниже, чем на этапах завершения гаструляции и выклева [Ханайченко, Гиригосов, 2021]. В процессе созревания ооцитов и роста личинок в начале репродуктивного цикла калкана, температурный оптимум выживаемости икры и личинок сдвинут к низким температурам. Наиболее оптимальная температура для развития эмбрионов и личинок калкана в середине и конце сезона находится в пределах 15–18 °С [Баяндина, 2011, 2020].

При низких температурах метаболизм замедлен, желток расходуется экономнее, на момент перехода на экзогенное питание личинки имеют более крупные размеры, что, вероятно, увеличивает успех в добывании пищи. Расходование желтка при более высоких температурах происходит быстрее. К моменту перехода на смешанное питание желточный мешок почти редуцирован, и личинка не может восполнить энергетические траты организма, в условиях отсутствия или недостатка экзогенного корма.

Различная термолабильность икры и личинок обеспечивает наилучшую эффективность воспроизводства калкана в различные фазы нерестового сезона (с апреля по июнь), когда температура поверхностных вод может резко меняться в пределах от 12 до 24 °С.

4.4. Влияние гидрологического режима на выживаемость икры, выживаемость и рост личинок калкана

В искусственных условиях одним из важных абиотических факторов, влияющих на выживаемость и качество посадочного материала (личинок на выклеве), являются гидродинамические условия, в частности, интенсивность продувки воздухом (барботажа) в инкубаторах для икры [Gaignon, 1998], формирующей разный уровень турбулентности в среде инкубации икры.

Проведенные в 2010 г. эксперименты по влиянию интенсивности продувки воздухом показали, что при инкубации икры без продувки (Рисунок 31), процент выклева составил 26 %, личинки на выклеве имели более крупные размеры тела ($SL=3130\pm 80$ мкм) и больший по объему желточный мешок ($VYS = 0,37 \times 10^9$ мкм³) по сравнению с личинками при слабой (выклев 18 %, $SL = 3100 \pm 50$ мкм, $YS = 0,32 \times 10^9$ мкм³) и сильной продувке (выклев 12 %, $SL = 3100 \pm 70$ мкм, $VYS = 0,29 \times 10^9$ мкм³).

Однофакторный дисперсионный анализ показал достоверность отличий размера тела личинок ($F = 2,4$, $p = 0,03$), объема их желточного мешка ($F = 2,5$, $p = 0,05$) и жировой капли ($F = 2,5$, $p = 0,05$) при различных режимах продувки воздухом. Выживаемость эмбрионов была достоверно выше без продувки ($F = 6,3$, $p = 0,02$) чем при слабой и сильной продувке воздухом, однако, взаимодействия факторов «продувка» и «возраст» были не достоверны ($F = 2,5$, $p = 0,06$).

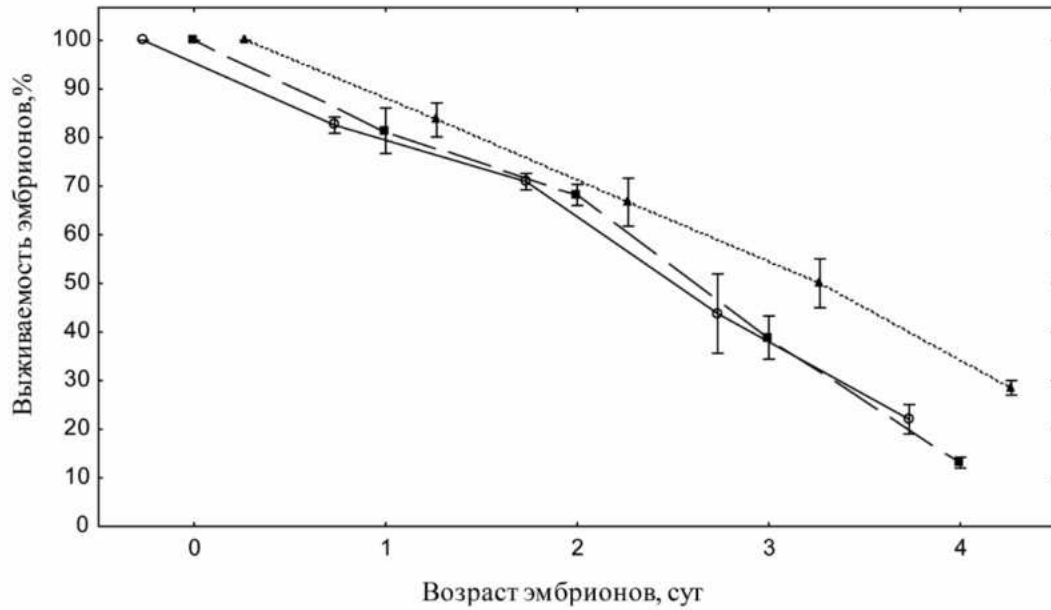


Рисунок 31 – Выживаемость эмбрионов от момента оплодотворения до выклева при различных условиях продувки воздухом (○ без продувки, □ при слабой продувке, △ при сильной продувке)

У выклюнувшихся предличинок после инкубации икры без барботажа наблюдали наибольший коэффициент вариации по стандартной длине тела $CV\ SL = 6,5\ %$ и наименьший разброс по коэффициентам вариации диаметра жировой капли $CV\ OD = 2,8\ %$ и объему желточного мешка $CV\ VYS = 0,29\ %$. Расход желточного мешка и жировой капли у них происходил медленнее и эффективнее, чем у личинок, инкубируемых в условиях слабой и сильной продувки, и как следствие, к выклеву были способны предличинки с различными размерами тела (SL).

Таблица 12 – Вариабельность размерных характеристик личинок на выклеве при различных режимах продувки

Режим инкубации	Выклев, %	SL, мкм	CV SL	OD, мкм	CV OD, %	VYS×10 ⁹ мкм ³	CV VYS
Без продувки	26%	3130	6,5	203	2,8	0,37	19
Слабая продувка	18%	3100	1,7	202	6,2	0,32	42
Сильная продувка	12%	3100	2,3	208	5,5	0,29	37

Выживаемость личинок в возрасте 1 сут (к концу первых суток после выклева), находящихся в режиме сильной продувки, была значимо выше – 86 % по

сравнению с выживаемостью личинок, инкубируемых без продувки – 56 % и при слабой продувке – 72 % ($F = 26, p = 0,01$) (Рисунок 32). Это можно объяснить тем, что при сильной продувке в течение эмбриогенеза происходила элиминация менее жизнеспособных (с вероятными скрытыми дефектами) и отбор более жизнеспособных личинок (выключилось лишь 14 % личинок от общего количества инкубируемых икринок).

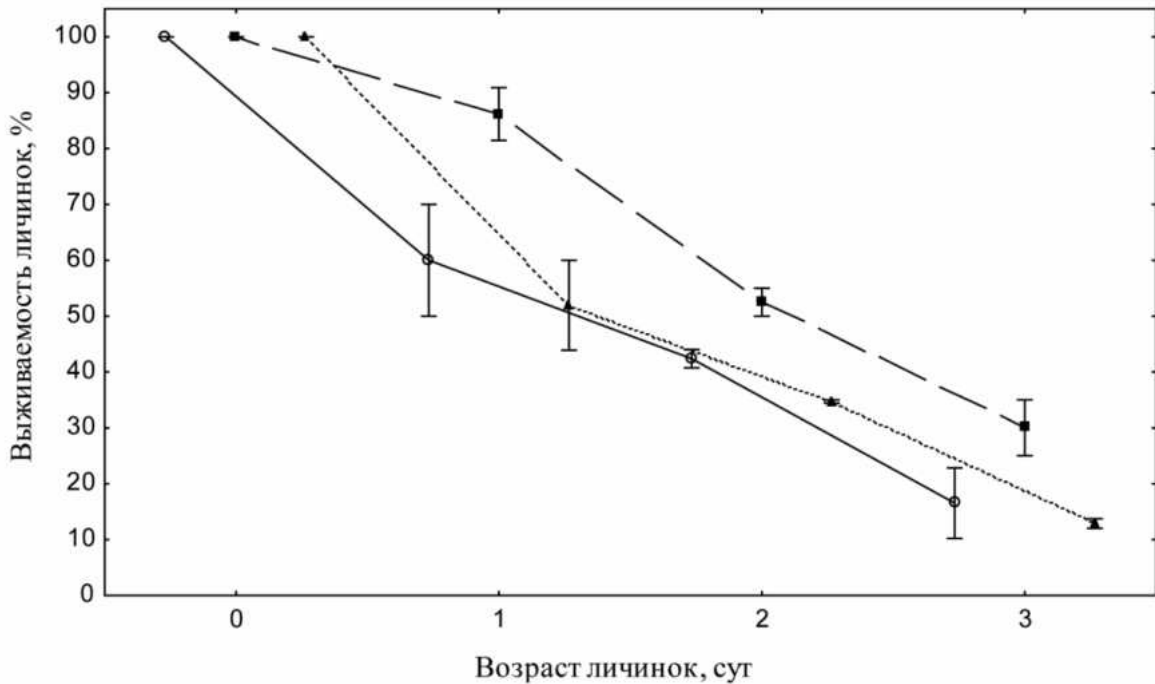


Рисунок 32 – Выживаемость личинок от момента выклева до перехода на экзогенное питание (◻ без продувки, ◻ при слабой продувке, ◻ при сильной продувке)

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что выживаемость личинок с момента вылупления и до третьих суток при различных режимах продувки значительно отличалась ($F = 10,5, p = 0,02$), взаимодействие факторов «продувка» и «возраст» были достоверны ($F = 2,9, p = 0,05$).

Результаты наших исследований подтверждают результаты по влиянию продувки воздухом на выживаемость предличинок калкана [Маслова, 2013]. Условия слабого барботажа благоприятны для повышения выживаемости эмбрионов калкана с незначительными врожденными дефектами, и в результате происходит выклев значительной доли личинок с нарушениями развития. Повышение

продувки (до 10–30 мл/мин) снижает долю выживаемости личинок от исходного количества икры в результате гибели слабых и нежизнеспособных особей на ранних этапах развития. Экспериментальные исследования по влиянию диффузной аэрации на личинок ложного палтуса *Paralichthys lethostigma* также показали, что относительно высокий уровень аэрации благоприятствует выживаемости ранних личинок со слабо развитой двигательной активностью [Mangino, 2006].

Проведенные эксперименты позволяют утверждать, что барботаж на уровне (30–75 мл/мин) негативно влияет на процент выклюнувшихся личинок, однако снижение доли выживших к моменту выклева, по-видимому, связано с элиминацией личинок с отклонениями развития. Таким образом продувка (30–75 мл/мин), имитирующая слабое перемешивание, на определённых этапах может оказаться эффективным способом отбора наиболее жизнеспособных ранних личинок (предличинок), что повысит долю выживших личинок к началу активного внешнего питания [Baiandina, 2018].

В течение нерестовых сезонов 2007–2010 гг. диаметр качественной оплодотворенной икры разных самок калкана находился в пределах от 1255 ± 14 мкм до 1352 ± 42 мкм, а диаметр жировой капли от 208 ± 7 до 224 ± 9 мкм. Морфологические параметры икры варьировали в зависимости от родительского фактора ($k = 0,61$, $p = 0,01$) и от фазы нерестового сезона ($k = 0,53$, $p = 0,03$). Обнаружена значимая корреляция между коэффициентом вариации стандартной длины личинок на выклеве и родительским фактором ($k = 0,70$, $p = 0,04$). Коэффициенты корреляции между другими факторами оказались недостоверными. Подтверждено, что толерантность к повышенным температурам в начале эмбриогенеза ниже, чем на этапах завершения гастрюляции и выклева. Оптимум температур для раннего развития калкана в начале сезона нереста сдвинут к 15 °С, к середине и концу к 15 – 18 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность реализации нерестового потенциала черноморской камбалы калкана *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814), одного из самых ценных промысловых видов рыб Чёрного моря и перспективного объекта марикультуры, определяется комплексом абиотических и биотических факторов. Успешность воспроизводства рыб определяется качеством половых продуктов производителей. Качество гамет варьирует под влиянием различных факторов.

В нашей работе проанализированы межгодовые вариации подвижности спермы самцов калкана на примере нерестовых популяций калкана Севастопольского региона. Показано, что активную сперму продуцируют до 90 % половозрелых самцов нерестового стада. Доля подвижных сперматозоидов в активированных черноморской водой индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана находилась в пределах от 30 до 99 %, соответственно. Средняя скорость движения сперматозоидов (100 ± 52 мкм/с) оказалась сопоставима с приведёнными в литературе данными для камбалообразных рыб. Максимальная скорость отдельных сперматозоидов (430 мкм/с) и более высокие средние скорости были зарегистрированы для самцов, выловленных в 2010 г. Предполагается, что производители нерестового стада 2010 г. находились в более благоприятных экологических условиях, что положительно повлияло на характеристики подвижности их спермы и соответственно ее качество.

Характеристики подвижности спермы для разных особей калкана из естественных популяций значительно варьируют, в целом длительность подвижности сперматозоидов существенно превышает подобные показатели не только для камбалообразных (до 7 часов), но и для большинства видов морских рыб, с которыми проводились аналогичные исследования. Нами показано, что на оценку характеристик активности спермы значимо влияют вариации применяемых методик и среды активации сперматозоидов, способ микроскопирования и степень разбавления спермы активирующей средой, а именно увеличение разбавления уменьшает скорости движения сперматозоидов, что может влиять на успешность

оплодотворения. В свою очередь методика микроскопирования может ухудшать параметры подвижности сперматозоидов, такие как скорость, процент подвижных сперматозоидов и общий период их подвижности.

Количественные характеристики подвижности спермы черноморского калкана свидетельствуют о высоком репродуктивном потенциале самцов данного вида в естественной популяции Севастопольского района и сопоставимым с таковыми для близкородственного вида – тюрбо *Scophthalmus maximus*.

Результаты экспериментов по оценке жизнеспособности эмбрионов при скрещивании производителей в течение нерестового сезона показали, что на ранних стадиях развития в начале нереста наблюдается высокий процент смертности. Высокая смертность икринок калкана на этапах эмбрионального развития связана с большим количеством нарушений эмбриогенеза, обусловленных, по-видимому, как нарушениями развития ооцитов, так и собственным геномом эмбрионов, оптимального сочетания температурных и кислородных, и отсутствия повышенной турбулентности.

Большая часть аномалий у зародышей возникала на ранних стадиях развития, предшествующих гастрюляции. Эти аномалии, по-видимому, были связаны с состоянием исходной неоплодотворенной икры калкана, так как большая часть аномалий заключалась в неправильном делении бластомеров и нарушениях мембранных структур зародыша и желтка. Считается, что большая часть аномалий, возникающих на стадиях до гастрюляции, происходит в результате нарушений состава запасных питательных веществ эмбриона, и (или) нарушений женского генома. Более поздние стадии развития эмбриона находятся уже под управлением характеристик генома зародыша. Процент аномалий на ранних стадиях развития снижался от начала к середине сезона. Относительный процент аномалий более позднего развития, по предварительным данным, возрастает к концу нерестового сезона.

Разнокачественность личинок калкана выражается как в размерных характеристиках вылупившихся личинок, так и в разной обеспеченности их желтком. Соответственно, вариации размеров выклюнувшихся личинок определяется

качеством половых продуктов, полученных от производителей. Выживаемость икры и личинок зависит не только от качества самой икры, т.е. от влияния материнского фактора, но и от качеств, наследуемых по отцовской линии.

Характеристики развития зародыша могут быть связаны с генетическими особенностями производителей и определять выживаемость как на ранних этапах онтогенеза, так и на более поздних стадиях развития на выклеве. Длина личинок калкана на выклеве и размеры их желточного мешка и жировой капли определяются комплексом материнского «фактора» и абиотических условий. Материнский «фактор» обусловлен как генетической наследственностью (включающей хромосомную и цитоплазматическую компоненту), так и индивидуальным состоянием (биохимическим составом) запасных веществ, содержащихся в желтке и жировой капле ооцита. Размер и качество (размеры и биохимический состав запасных веществ в желтке и жировой капле) икры самок могут значительно влиять на скорость роста и выживаемость в период раннего развития личинок.

Обнаруженные нами различия в скорости развития эмбрионов и достоверные различия длины личинок полу-сибсов калкана по отцовской линии, разница в скорости роста личинок на стадии экзогенного питания (до раскрытия рта), использования желтка и жировой капли от выклева до момента раскрытия рта (при исходных одинаковых характеристиках икры, полученной от одной самки), связаны с наследственностью, переданной от самцов. Отцовский фактор может в значительной мере определять выживаемость и характеристики личинок калкана к моменту перехода на внешнее питание. Синергетический эффект влияния плохого качества гамет обоих полов может приводить не только к низкому проценту нормального оплодотворения и/или к низкому качеству потомства, которые приводят к значительному снижению эффективности воспроизводства популяции.

Собственные данные экспериментальных исследований развития эмбрионов и личинок, полученных при искусственном оплодотворении черноморского калкана, показали, что длина личинок на выклеве и при переходе на внешнее питание (3–4 сут после выклева) зависит от комбинации биотических и абиотических факторов, а именно: «материнский» фактор (качество желтковых запасов икры и ге-

нетическая составляющая), «отцовский» фактор (генетическая составляющая) и (в отсутствии мутагенных факторов) значительную роль оказывает температурный фактор, влияние которого складывается из температуры, при которой развивался ооцит, температуры при которой происходило оплодотворение и развитие до момента выклева. Соответственно, стандартная длина личинки калкана на выклеве под влиянием совокупности указанных факторов может варьировать от 2870 до 3200 мкм. Температура оказывает влияние на скорость утилизации желтка и его использование на рост предличинки калкана до ее перехода на экзогенное питание.

Термочувствительность эмбрионов, находящихся на разных этапах развития, и полученных от производителей в разные фазы нерестового сезона различна. Толерантность к повышенным температурам в начале эмбриогенеза ниже, чем на этапах завершения гастрюляции и выклева. Температурный оптимум выживаемости икры и личинок, полученных в начале естественного нерестового сезона калкана, сдвинут к температуре 15 °С. Температурный оптимум развития эмбрионов и личинок калкана в середине и конце нерестового сезона находится в диапазоне 15–18 °С. Проведенные нами исследования по выживаемости икры калкана позволяют предположить различный диапазон термопреферендума икры и личинок, полученных от производителей в разные фазы нерестового периода.

Проведенные эксперименты по влиянию гидрологического режима позволяют утверждать, что сильный барботаж негативно влияет на выживаемость личинок калкана на выклеве, однако элиминация личинок с отклонениями развития может оказаться эффективным способом отбора наиболее жизнеспособных ранних личинок для повышения выживаемости при дальнейшем развитии.

Таким образом эффективность реализации репродуктивного потенциала черноморского калкана находится под влиянием комплекса биотических (качества исходных гамет, зависящих от состояния производителей к нерестовому сезону) факторов, которые реализуются в зависимости от комплекса абиотических факторов (температурных и гидрологических условий).

ВЫВОДЫ

1. Для спермы черноморской камбалы калкана из нерестовых популяций установлены следующие характеристики активности: средняя скорость движения сперматозоидов составляет 100 ± 52 мкм/с. (при максимальной – 427 мкм/с) и доля подвижных сперматозоидов находилась в пределах от 30 до 99 %. Концентрация сперматозоидов в сперме находилась в пределах от $4,8 \times 10^5$ до 7×10^6 сп./мкл, средняя концентрация – $1,5 \times 10^6$ сп./мкл за все года.

2. На показатели активности сперматозоидов существенное влияние оказывают способы активации спермы, степень ее разбавления и методы подготовки препарата для микроскопирования. Для полной активации спермы калкана достаточно 10 % разбавления семенной жидкости морской водой, самая высокая активность спермы достигается при её разбавлении в соотношении не более 1:10.

3. Высокие показатели активности спермы черноморского калкана сохраняются в течение первых 20 мин после ее активации морской водой. Длительность активности спермы отдельных самцов после ее активации может достигать 7 часов, максимальные для всех камбалообразных.

4. Одним из важных критериев качества икры калкана является низкий коэффициент вариабельности размеров икринок и симметрии большинства развивающихся эмбриональных структур.

5. Диаметр качественной оплодотворенной икры для разных самок калкана составлял от 1250 до 1370 мкм, а диаметр жировой капли – от 200 до 235 мкм.

6. Оптимум температур для развития и выживаемости эмбрионов и личинок калкана в начале репродуктивного сезона сдвинут к температурам (15 °С), в середине и конце сезона находится в пределах 15–18 °С. На выклеве при 15 °С только что выклюнувшиеся личинки имеют существенно меньшую длину тела, по сравнению с личинками, содержащимися при 18 и 21 °С, но к моменту перехода на внешнее питание обгоняют их в росте. Эффективность использования желтка на рост достоверно выше при 15 °С.

7. Впервые для калкана изучено влияние отцовского фактора на выживаемость и характеристики личинок на выклеве и переходе на внешнее питание. Вариабельность размеров личинок на этапе перехода на внешнее питание определяется как материнским, так и отцовским факторами.

8. Выявлено, что на этапах эмбрионального развития наличие слабого барботажа является фактором, негативно влияющим на выживаемость эмбрионов, но выживаемость личинок от выклева до перехода на внешнее питание повышается и происходит отбор более жизнеспособных личинок.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – Аденозиндифосфат

АМФ – Аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг-гормон

ГСИ – гонадосоматический индекс

ЛГ – лютеинизирующий гормон

Пк – пиксел

цАМФ – Циклический аденозинмонофосфат

CASA – computer assisted sperm analysis, плагин для компьютерного анализа спермы

D – диаметр икры, мкм,

OD – диаметр жировой капли, мкм.

OD – диаметр жировой капли, мкм;

S_L – стандартная длина рыбы

Sl – стандартная длина личинки, мкм,

T_L – абсолютная длина тела рыбы

VCL – скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (мкм/с)

VYS – объем желточного мешка, мкм³

W_G – масса гонад

W_L – массу печени

Ws – соматическая масса тела, масса тела без внутренностей,

Wt –общая масса тела

C3 – ключевой компонент комплемента, участвующий в обеспечении неспецифической устойчивости (резистентности) организма к бактериальной инфекции.

C4 – компонент классического пути активации комплемент (взаимодействия компонентов комплемента с комплексом антиген-антитело), имеющий важное значение в развитии аутоиммунных заболеваний

Сп. – сперматозоид

F – критерий Фишера

H – ранговый критерий Крускала – Уоллиса

U – критерий Манна – Уитни

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Басова, М. М. Роль печени в генеративном процессе у камбаловых рыб (на примере черноморского калкана *Psetta maeotica*) / М. М. Басова // Экология моря. – 2000. – Вып. 52. – С. 64–67.

Баяндина, Ю. С. Применение метода компьютерного анализа при оценке качества гамет камбалы калкан / Ю. С. Баяндина, М. П. Кирин // «Pontus Euxinus – 2007» : тез. V Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем, 24–27 сентября 2007 г. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. – С. 9–10.

Баяндина, Ю. С. Вариабельность размеров икры и личинок в зависимости от комплекса факторов / Ю. С. Баяндина // «Pontus Euxinus – 2011» : тез. VII Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем, 24–27 мая 2011 г. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 34–35.

Баяндина, Ю. С. Характеристики подвижности спермы черноморской камбалы калкана из естественных популяций / Ю. С. Баяндина // Морской экологический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 11–18.

Баяндина, Ю. С. Вариабельность характеристик спермы камбалы калкан в зависимости от фазы нерестового периода / Ю. С. Баяндина // «Pontus Euxinus – 2013» : тез. VIII Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем, 1–4 октября 2013 г. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2013. – С. 21–22.

Баяндина, Ю. С. Термочувствительность икры и личинок камбалы калкана, полученных от разных производителей, в разные фазы нерестового сезона / Ю. С. Баяндина // Современная гидробиология: глобальные проблемы Мирового океана : материалы XI Всероссийской онлайн-школы-семинара для молодых ученых, студентов и аспирантов, г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2020 г. – Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2020. – С. 9–10.

Белокопытов, В. Н. Климатические изменения гидрологического режима Чёрного моря : автореф. дис. ... д-ра геогр. наук : 25.00.28 / В. Н. Белокопытов. – Севастополь, 2017. – 42 с.

Битюкова, Ю. Е. Термочувствительность калкана *Psetta maeotica* (Pallas) (Scophthalmidae) в период эмбрионального развития при искусственном выращивании / Ю. Е. Битюкова, Н. К. Ткаченко, А. В. Чепурнов // Вопросы ихтиологии. – 1984. – Т. 24, вып. 3. – С. 459–463.

Битюкова, Ю. Е. Морфо-экологические особенности раннего онтогенеза черноморской камбалы калкана *Psetta maeotica* (Pallas) в условиях искусственного выращивания : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.10 / Ю. Е. Битюкова. – Москва, 1989. – 24 с.

Битюкова, Ю. Е. Влияние солености на эмбриональное развитие черноморской камбалы калкана *Psetta maeotica* (Pallas) / Ю. Е. Битюкова, Н. К. Ткаченко // Экология моря. – 1998. – Вып. 47. – С. 25–28.

Битюкова, Ю. Е. Температурные адаптации черноморской камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus maeoticus* Pallas в период эмбрионального развития / Ю. Е. Битюкова, В. А. Терещенко, Н. К. Ткаченко, А. В. Чепурнов // 5-я Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб : тезисы докладов. – Киев, 1982. – Ч. 3. – С. 14–15.

Бойко, Н. Е. Характеристика функционального состояния черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus maeoticus* в различные периоды репродуктивного цикла по материалам исследований 2009–2017 гг. / Н. Е. Бойко, Л. П. Ружинская // Труды АзНИИРХ. – 2019. – Т. 2. – С. 31–39.

Болтачев, А. Р. Морские рыбы Крымского полуострова / А. Р. Болтачев, Е. П. Карпова. – Симферополь : Бизнес-Информ, 2017. – 376 с.

Булли, Л. И. К биотехнологии разведения камбалы калкан азово-черноморского бассейна / Л. И. Булли // Балтийский морской форум : материалы VI Балтийского морского форума, 3-6 сентября 2018 г. – Калининград : Изд-во БГАРФ, 2018. – Т. 3: Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоёмов. – С. 4–9.

Булли, Л. И. Азовская камбала–калкан – перспективный объект марикультуры / Л. И. Булли // Рыбное хозяйство. – 2015. – № 2. – С. 100–103.

Владимиров, В. И. Качество родителей и жизнестойкость потомства на ранних этапах жизни у некоторых видов рыб / В. И. Владимиров, К. И. Семенов, В. Н. Жукинский // Теоретические основы рыбоводства. – Москва : Наука, 1965. – С. 19–32.

Власов, В. А. Влияние наследственности родителей и качества рациона на рост потомства карпа / В. А. Власов, Н. И. Маслова // Природообустройство. – 2017. – № 5. – С. 123–130.

Воробьева, Н. К. Исследования созревания самок черноморской камбалы-калкана (*Scophthalmus maeoticus* Pallas) в экспериментальных условиях / Н. К. Воробьева, М. Г. Таликина, А. П. Золотницкий // Биологические основы морской аквакультуры. – Киев : Наукова думка, 1975. – Вып. 1. – С. 42–51.

Воробьева, Н. К. Результаты анализа созревания самок черноморской камбалы-калкана / Н. К. Воробьева, М. Г. Таликина // Труды ВНИРО. – 1976. – Т. 115. – С. 51–56.

Гинзбург, А. С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии / А. С. Гинзбург. – Москва : Наука, 1968. – 358 с.

Гирагосов, В. Е. Оценка состояния природной популяции и культивирование черноморской камбалы-калкана в ИнБЮМ (ИМБИ): достижения, ограничения и перспективы / В. Е. Гирагосов, А. Н. Ханайченко, Т. В. Рауэн, Л. О. Аганесова, Ю. С. Баяндина, Д. Ю. Смирнов // Актуальные проблемы аквакультуры в современный период : материалы международной научной конференции, Ростов-на-Дону, 28.09–02.10.2015. – Ростов-на-Дону : АзНИИРХ, 2015. – С. 43–46.

Гирагосов, В. Е. Формирование и реализация плодовитости у черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus* (Scophthalmidae) на юго-западном шельфе Крымского полуострова / В. Е. Гирагосов // Вопросы ихтиологии. – 2020. – Т. 60, № 4. – С. 442–451. – <https://doi.org/10.31857/S0042875220040062>

Гирагосов, В. Е. Характер и причины изменчивости основных показателей состояния нерестовой популяции черноморской камбалы калкан на юго-западном

шельфе Крыма / В. Е. Гиригосов, А. Н. Ханайченко, Д. В. Ельников // Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона : материалы III Международной конференции, 10-11 октября 2007 г., Керчь, ЮгНИРО. – Керчь : Изд-во ЮгНИРО, 2008. – С. 3–9.

Гордина, А. Д. Многолетние колебания численности икринок камбалы калкана *Psetta Maeotica* (Scophthalmidae) в районе Севастополя / А. Д. Гордина // Вопросы ихтиологии. – 1999. – Т. 39, № 6. – С. 850–853.

Гордина, А. Д. О нересте камбалы-калкан – *Psetta maeotica* (Pallas) (Scophthalmidae, Pisces) в Чёрном море в мае-июне 1987 г. / А. Д. Гордина // Экология моря. – 1990. – Вып. 35. – С. 40–43.

Дехник, Т. В. Эмбриональное и постэмбриональное развитие азовской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus torosus* (Rathke) / Т. В. Дехник, А. В. Карпенко // Биология моря. – 1976. – Вып. 38: Вопросы экологии рыб и кальмаров. – С. 18–23.

Дехник, Т. В. Ихтиопланктон Чёрного моря / Т. В. Дехник. – Киев : Наукова думка, 1973. – 235 с.

Емельянова, Н. Г. Состояние гонад, подвижность сперматозоидов и начальные стадии эмбрионального развития *Upeneus tragula* (mullidae) / Н. Г. Емельянова, Д. А. Павлов, Т. Б. Т. Льюнг, Т. Х. Во // Вопросы ихтиологии. – 2015. – Т. 55, № 2. – С. 196–206.

Зернов, С. А. К вопросу об изучении жизни Чёрного моря / С. А. Зернов // Записки Императорской Академии наук. Сер. 8. – 1913. – Т. 32, вып. 1. – С. 252–254.

Иванов, В. Н. Получение икры камбалы-калкана для инкубации в лабораторных условиях. Опыт массовой инкубации экспериментального материала / В. Н. Иванов // Биологические основы морской аквакультуры. – Киев : Наукова думка, 1975. – Вып. 1. – С. 21–23.

Карапеткова, М. Върху разпределението и миграциите на калкана по българското крайбрежие / М. Карапеткова // Рибно стопанство. – 1964. – № 7 (3). – С. 18–22.

Климова, Т. Н. Особенности вертикального распределения икринок камбалы-калкана *Psetta maeotica* (Pallas) (Scophthalmidae Pisces) в Чёрном море / Т. Н. Климова ; АН УССР, ИнБЮМ. – Севастополь, 1993. – Деп. в ВИНТИ 20.05.93; № 1346-В93. – 16 с.

Копейка, Е. Ф. Консервирование спермы рыб // Криоконсервирование клеточных суспензий / Е. Ф. Копейка, А. Н. Новиков ; под ред. А. А. Цуцаевой. – Киев : Наукова думка, 1983. – С. 204–215.

Куманцов, М. И. Черноморская камбала-калкан: состояние запасов и пути их сохранения и восстановления / М. И. Куманцов // Труды ВНИРО. – 2013. – Т. 150. – С. 21–34.

Куцын, Д. Н. Первое обнаружение калкана *Scophthalmus maeoticus* (Scophthalmidae) в приустьевом взморье р. Дон / Д. Н. Куцын, А. В. Старцев // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 70–76. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.3.07>

Марти, Ю. Ю. Материалы к биологии черноморской камбалы-калкана (*Rhombus maeoticus* Pallas) / Ю. Ю. Марти // Сборник, посвященный научной деятельности Н. М. Книповича (1885–1939). – Москва : Изд-во АН СССР, 1939. – С. 232–253.

Маслова, О. Н. Разведение и товарное выращивание черноморской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus*: проблемы и методы / О. Н. Маслова // Труды ВНИРО. – 2013. – Т. 150. – С. 35–49.

Надолинский, В. П. Камбалы российских вод Чёрного моря / В. П. Надолинский, В. Д. Дахно, С. А. Кольвах // Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоёмов Азово-Черноморского бассейна (1996–1997 гг.) : сборник научных трудов АзНИИРХ. – Ростов-на-Дону, 1998. – С. 161–167.

Мельник, А. В. Характеристики поля биолюминесценции в прибрежье Севастополя: результаты многолетнего мониторинга / А. В. Мельник, В. В. Мельников, А. Н. Серебренников, Л. А. Мельник, О. В. Машукова // Системы контроля окружающей среды. – 2019. – Т. 1. – С. 79–87.

Надолинский, В. П. Камбалы Азово-Черноморского бассейна (Bothidae, Scophthalmidae, Pleuronectidae, Soleidae) / В. П. Надолинский, В. А. Шляхов, У. Н. Александрова // Вопросы рыболовства. – 2018. – Т. 19, № 4. – С. 424–444.

Овен, Л. С. Специфика развития половых клеток морских рыб в период размножения как показатель типа нереста и реакции на условия среды обитания / Л. С. Овен. – Москва : Изд-во ВНИРО, 2004. – 188 с.

Овен, Л. С. Размерно-возрастной состав и репродуктивная биология черноморского калкана *Psetta maxima maeotica* / Л. С. Овен, Н. Ф. Шевченко, Ю. Е. Битюкова, А. Р. Болтачев, О. В. Пантелеева // Вопросы ихтиологии. – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 631–636.

Павлов, Д. А. Метод оценки качества спермы рыб / Д. А. Павлов // Вопросы ихтиологии. – 2006. – Т. 46, № 3. – С. 384–392.

Павлов, Д. А. Морфологические критерии качества икры морских рыб: активация и дробление яиц *Zebrasoma scopas* (Acanthuridae) / Д. А. Павлов, Н. Г. Емельянова // Вопросы ихтиологии. – 2008. – Т. 48, № 4. – С. 537–552.

Персов, Г. М. Некоторые данные по выживаемости спермиев севрюги (*Acipenser stellatus*) / Г. М. Персов // Доклады АН СССР. – 1941. – Т. 33, № 4. – С. 327–329.

Попова, В. П. Исследование биологии камбалы калкана в связи с вопросами её искусственного воспроизводства / В. П. Попова // Биологические основы морской аквакультуры. – Киев : Наукова думка, 1975. – Вып. 1. – С. 5–12.

Пятинский, М. М. Определение длины, при которой наступает половая зрелость у черноморского калкана (*Scophthalmus maeotica maeotica*) / М. М. Пятинский // Труды Южного научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии. – 2017. – Т. 54, № 1. – С. 71–76.

Рикер, У. Е. Методы оценки и интерпретации биологических показателей популяций рыб / У. Е. Рикер. – Москва : Пищевая промышленность, 1979. – 408 с.

Сакур, О. Ф. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб / О. Ф. Сакур, Н. А. Буцкая. – Мурманск : Изд-во Главрыбвод, 1968. – 47 с.

Таликина, М. Г. Овогенез и половой цикл черноморской камбалы *Scophthalmus maeoticus maeoticus* (Pallas) / М. Г. Таликина // Вопросы ихтиологии. – 1974. – Т. 14, № 3 (86). – С. 436–444.

Таликина, М. Г. Сперматогенез и половой цикл самцов камбалы-калкана (*Scophthalmus maeoticus* Pallas) / М. Г. Таликина // Биологические основы морской аквакультуры. – Киев : Наукова думка, 1975. – Вып. 1. – С. 30–42.

Туркулова, В. Н. Эколого-физиологические особенности стимуляции созревания производителей черноморского калкана (*Psetta maeotica maeotica* Pallas) в условиях искусственного воспроизводства / В. Н. Туркулова, Н. В. Новоселова // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона : материалы VII Международной конференции, Керчь, 20-23 июня 2012 г. – Керчь : ЮгНИРО, 2012. – Т. 2. – С. 22–29.

Ханайченко, А. Н. Дыхание икры черноморского калкана (*Scophthalmus maeoticus*) как показатель ее развития / А. Н. Ханайченко, Л. С. Светличный, В. Е. Гиригосов, Е. С. Губарева // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2017. – Т. 10, № 1. – С. 9–19. – <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0004>

Ханайченко, А. Н. Морфологические особенности черноморского калкана (*Scophthalmus maeoticus*) в период эмбрионального развития / А. Н. Ханайченко, В. Е. Гиригосов // Морской биологический журнал. – 2019. – Т. 4, № 4. – С. 62–81. – <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.06>

Ханайченко, А. Н., Гиригосов, В. Е. Черноморский калкан и его ближайший родственник, тюрбо / А. Н. Ханайченко, В. Е. Гиригосов ; Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН. – Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2021. – Ч. 1. – 252 с. – <https://doi.org/10.21072/978-5-6044865-6-6>

Шляхов, В. А. Промыслово-биологические показатели черноморского калкана и состояние его запасов в водах, прилегающих к Крыму, в 2000–2018 гг. / В. А. Шляхов, М. М. Пятинский, О. В. Шляхова // Труды АзНИИРХ. – 2019. – Т. 2. – С. 9–29.

Шульман, Г. Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб / Г. Е. Шульман. – Москва : Пищевая промышленность, 1972. – 368 с.

Alavi, S. M. H. Sperm motility in fishes: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme / S. M. H. Alavi, J. Cosson, O. Bondarenko, O. Linhart // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 136. – P. 143–165. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.038>

Alavi, S. M. H. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility / S. M. H. Alavi, M. Rodina, T. Policar, P. Kozak, M. Psenicka, O. Linhart // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68, iss. 2. – P. 276–283. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.045>

Alavi, S. M. H. Sperm motility in fishes: (III) Diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme / S. M. H. Alavi, J. Cosson, O. Bondarenko, O. Linhart // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 136. – P. 143–165. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.038>

Alavi, S. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review / S. M. H. Alavi, J. Cosson // *Cell Biology International*. – 2005. – Vol. 29, iss. 2. – P. 101–110. – <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021>

Avery, T. S. The relationship of embryonic development, mortality, hatching success, and larval quality to normal or abnormal early embryonic cleavage in Atlantic cod, *Gadus morhua* / T. S. Avery, S. S. Killen, T. R. Hollinger // *Aquaculture*. – 2009. – Vol. 289, iss. 3–4. – P. 265–273. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.011>

Barton, L. A. Egg-quality of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) kept in captive conditions. PhD Thesis / L. A. Barton ; University of Liverpool, U. K. – Liverpool, 1981. – 127 p.

Baiandina, Iu. S. Water turbulence effect on egg survival and characteristics of hatched larvae of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) / Iu. S. Baiandina, A. N. Khanaychenko // *Morskoj biologicheskij zhurnal*. – 2018. – Vol. 3, no. 4. – P. 101–105. – <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.4.11>

Baiandina, Iu. S. Optimization of the method for determining the motility characteristics of fish spermatozoa using imageJ software and excel macros / Iu. S. Baiandi-

na, A. N. Khanaychenko // *Journal of Ichthyology*. – 2019. – Vol. 59, iss. 1. – P. 127–130. – <https://doi.org/10.1134/S0032945219010016>

Baiandina, Iu. Black Sea turbot sperm motility depending on the dilution of seawater / Iu. Baiandina // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2021. – Vol. 937, art. no. 022076 (5 p.). – <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022076>

Baiandina, Iu. Male reproductive potential in the Black Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) spawning populations / Iu. Baiandina, V. Giragosov, A. Khanaychenko // *Fisheries Research*. – 2022. – Vol. 253. – Art. no. 106367 (9 p.). – <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106367>

Beck, J. C. Sperm surface antigen required for fertility: identification on spermatozoa of rainbow trout by use of monoclonal antibodies / J. C. Beck, K. D. Fulcher, C. F. Beck, J. G. Cloud // *Transactions of the American Fisheries Society*. – 1992. – Vol. 121, iss. 3. – P. 333–339. – [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1992\)121<0333:SSARFF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1992)121<0333:SSARFF>2.3.CO;2)

Beirao, J. Wild Atlantic cod sperm motility is negatively affected by ovarian fluid of farmed females / J. Beirao, C. F. Purchase, B. F. Wringe, I. A. Fleming // *Aquaculture Environment Interactions*. – 2014. – Vol. 5. – P. 61–70. – <https://doi.org/10.3354/aei00095>

Billard, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species / R. Billard // *Reproduction Nutrition Development*. – 1986. – Vol. 26, no. 4. – P. 877–920. – <https://doi.org/10.1051/rnd:19860601>

Bobe, J. Egg quality in fish: Present and future challenges / J. Bobe // *Animal Frontiers*. – 2015. – Vol. 5, iss. 1. – P. 66–72. – <https://doi.org/10.2527/af.2015-0010>

Bobe, J. Egg and sperm quality in fish / J. Bobe, C. Labbé // *General and Comparative Endocrinology*. – 2010. – Vol. 165, iss. 3. – P. 535–548. – <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>

Boryshpolets, S. Fish sperm motility analysis: the central role of the flagellum / S. Boryshpolets, V. Kholodnyy, J. Cosson, B. Dzyuba // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30, iss. 6. – P. 833–841. – <https://doi.org/10.1071/rd17478>

Brokaw, C. J. CO₂ regulation of the amplitude of flagellar bending. In: Cell motility : Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation / C. J. Brokaw, T. F. Simonick ; Eds: R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum. – New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1976. – P. 933–940.

Bromage, N. Egg quality determinants in finfish the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* / N. Bromage, M. Bruce, N. Basavaraja, K. Rana, R. Shields, C. Young, J. Dye, P. Smith, M. Gillespie, J. Gamble // Journal of the World Aquaculture Society. – 1994. – Vol. 25, iss. 1. – P. 13–21. – <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00799.x>

Brooks, S. Egg quality in fish: what makes a good egg? / S. Brooks, C. R. Tyler, J. P. Sumpter // Reviews in Fish Biology and Fisheries. – 1997. – Vol. 7, no. 4. – P. 387–416. – <https://doi.org/10.1023/A:1018400130692>

Cardozo, G. Female nutritional condition affects ovarian fluid quality in guppies / G. Cardozo, A. Pilastro // Biology Letters. – 2018. – Vol. 14, iss. 5. – Art. no. 20180122 (4 p.). – <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0122>

Chambers, R. C. Maternal influences on variation in egg sizes in temperate marine fishes / R. C. Chambers, W. C. Leggett // American Zoologist. – 1996. – Vol. 36, iss. 2. – P. 180–196. – <https://doi.org/10.1093/icb/36.2.180>

Chauvaud, L. Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: initiation of movement and changes with time of swimming characteristics / L. Chauvaud, J. Cosson, M. Suquet // Environmental Biology of Fishes. – 1995. – Vol. 43, iss. 4. – P. 341–349. – <https://doi.org/10.1007/BF00001167>

Ciereszko, A. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study / A. Ciereszko, K. Dabrowski // Biology of Reproduction. – 1995. – Vol. 52, iss. 5. – P. 982–988. – <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.982>

Collins, T. J. ImageJ for Microscopy / T. J. Collins // BioTechniques Journal. – 2007. – Vol. 43, no. 1, suppl. – P. 25–30. – <https://doi.org/10.2144/000112517>

Cosson, J. Fish sperm physiology: structure, factors regulating motility, and motility evaluation // Biological Research in Aquatic Science / J. Cosson ; Ed. Y. Bozkurt.

– London : IntechOpen, 2019. – Chap. 2. – P. 1–26.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.85139>

Cosson, J. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers / J. Cosson, A.-L. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno, R. Billard // *Reproduction*. – 2008. – Vol. 136, iss. 3. – P. 277–294. – <https://doi.org/10.1530/REP-07-0522>

Cosson, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa / J. Cosson // *Aquaculture International*. – 2004. – Vol. 12, iss. 1. – P. 69–85. – <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>

Cosson, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence / J. Cosson // *Journal of Fish Biology*. – 2010. – Vol. 76, iss. 1. – P. 240–279. – <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>

Cunha, I. Expression of intercellular lipid transport and cholesterol metabolism genes in eggs and early larvae stages of turbot, *Scophthalmus maximus*, a marine aquaculture species / I. Cunha, S. Galante Oliveira, E. Rocha, R. Urbatzka, L. F. C. Castro // *Marine Biology*. – 2015. – Vol. 162, iss. 8. – P. 1673–1683. – <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2706-9>

Dadras, H. Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review / H. Dadras, B. Dzyuba, J. Cosson, A. Golpour, M. A. M. Siddique, O. Linhart // *Aquaculture Research*. – 2017. – Vol. 48, iss. 3. – P. 729–740. – <https://doi.org/10.1111/are.13049>

Devauchelle, N. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity / N. Devauchelle, J. C. Alexandre, N. Le Corre, Y. Letty // *Aquaculture*. – 1988. – Vol. 69, iss. 1–2. – P. 159–184. – [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90194-9)

Dietrich, G. J. Broken eggs decrease pH of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian fluid / G. J. Dietrich, M. Wojteczak, M. Słowinska, S. Dobosz, H. Kuzminski, A. Ciereszko // *Aquaculture*. – 2007. – Vol. 273, iss. 4. – P. 748–751. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.013>

Dreanno, C. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*) / C. Dreanno, M. Suquet, E. Desbruyeres, J. Cosson, H. Le Delliou, R. Billard // *Aquacul-*

ture. – 1998. – Vol. 169, iss. 3–4. – P. 247–262. – [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00262-2)

Dreanno, C. Nucleotide content, oxydative phosphorylation, morphology and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period / C. Dreanno, J. Cosson, M. Suquet, F. Seguin, G. Dorange, R. Billard // Molecular Reproduction and Development. – 1999. – Vol. 53, iss. 2. – P. 230–243. – [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<230::AID-MRD12>3.0.CO;2-H)

Fauvel, C. Evaluation of fish sperm quality / C. Fauvel, M. Suquet, J. Cosson // Journal of Applied Ichthyology. – 2010. – Vol. 26, iss. 5. – P. 636–643. – <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x>

Feng, C. Progesterin is important for testicular development of male turbot (*Scophthalmus maximus*) during the annual reproductive cycle through functionally distinct progesterin receptors / C. Feng, S. Xu, Y. Liu, Y. Wang, W. Wang, J. Yang, C. Zhao, Q. Liu, J. Li // Fish Physiology and Biochemistry. – 2018. – Vol. 44, iss. 1. – P. 35–48. – <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0411-y>

Finn, R. N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria / R. N. Finn // Aquatic Toxicology. – 2007. – Vol. 81, iss. 4. – P. 337–354. – <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.021>

Gaignon, J. L., Petton, B., Quemener, L. Influence de l'hydrodynamique des bassins sur la survie et la croissance des larves de turbot (*Psetta maxima*) / J. L. Gaignon, B. Petton, L. Quemener // Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. – 1998. – No. 350–351. – P. 303–323. – <https://doi.org/10.1051/kmae:1998007>

Gallego, V. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems / V. Gallego, J. F. Asturiano // Reproduction, Fertility and Development. – 2018. – Vol. 30, iss. 6. – P. 820–832. – <https://doi.org/10.1071/rd17460>

Geffen, A. J. Retention of sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus* L.: the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels / A. J. Geffen, O. Frayer // Aquaculture Research. – 1993. – Vol. 24, iss. 2. – P. 203–209. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00542.x>

Gibson, S. Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus* / S. Gibson, I. A. Johnston // *Marine Biology*. – 1995. – Vol. 124, iss. 1. – P. 17–25. – <https://doi.org/10.1007/BF00349142>

Gosz, E. Enzymatic activities in spermatozoa and butyltin concentrations in Baltic turbot (*Scophthalmus maximus*) / E. Gosz, J. Horbowy, W. Ruczyńska, M. S. Ziętara // *Marine Environmental Research*. – 2011. – Vol. 72, iss. 4. – P. 188–195. – <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.004>

Gosz, E. Morphometry of turbot spermatozoa in relation to the location and time of capture during the spawning season / E. Gosz, Z. Mirny, J. Horbowy, M. S. Ziętara // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2010. – Vol. 26, iss. 5. – P. 784–788. – <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01547.x>

Holt, W. V. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality / W. V. Holt, K. J. W. Van Look // *Reproduction*. – 2004. – Vol. 127, iss. 5. – P. 527–535. – <https://doi.org/10.1530>

Inaba, K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling / K. Inaba // *Zoological Science*. – 2003. – Vol. 20, no. 9. – P. 1043–1056. – <https://doi.org/10.2108/zsj.20.1043>

Inaba, K. Control of sperm motility by CO₂ and carbonic anhydrase in flatfish / K. Inaba, C. Dreanno, J. Cosson // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2003. – Vol. 55, iss. 3. – P. 174–187. – <https://doi.org/10.1002/cm.10119>

Inaba, K. Molecular mechanism of the activation of flagellar motility in sperm / K. Inaba // *Fish Spermatology* / Eds: S. M. H. Alavi, J. J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee. – Oxford, U. K. : Alpha Science International Ltd, 2008. – P. 281–316.

Ivanov, L. The fisheries resources of the Mediterranean. Part 2: Black Sea / L. Ivanov, R. J. H. Beverton. – Rome : FAO, 1985. – 135 p. – (GFCM Studies and Reviews ; no. 60.).

Jia, Y. D. Biochemical composition of the ovarian fluid and its effects on the fertilization capacity of turbot *Scophthalmus maximus* during the spawning season / Y.

D. Jia, H. X. Niu, Z. Meng, X. F. Liu, J. L. Lei // *Journal of Fish Biology*. – 2015. – Vol. 86, iss. 5. – P. 1612–1620. – <https://doi.org/10.1111/jfb.12676>

Kanuga, M. K. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) / M. K. Kanuga, R. E. Drew, J. G. Wilson-Leedy, R. L. Ingermann // *Theriogenology*. – 2012. – Vol. 77, iss. 5. – P. 916–925. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.020>

Killgore, K. J. Effects of turbulence on yolk-sac larvae of paddlefish / K. J. Killgore, A. C. Miller, K. C. Conley // *Transactions of the American Fisheries Society*. – 1987. – Vol. 116, iss. 4. – P. 670–673. – [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1987\)116<670:EOTOYL>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)116<670:EOTOYL>2.0.CO;2)

Kime, D. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals / D. Kime, M. Ebrahimi, K. Nysten, I. Roelants, E. Rurangwa, H. D. M. Moore, F. Ollevier // *Aquatic Toxicology*. – 1996. – Vol. 36, iss. 3–4. – P. 223–237. – [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00806-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00806-5)

Kime, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish / D. Kime, K. J. Van Look, B. McAllister, G. Huyskens, E. Rurangwa, F. Ollevier // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2001. – Vol. 130, iss. 4. – P. 425–433. – [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00270-8](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00270-8)

Kjørsvik, E. Egg quality in fishes / E. Kjørsvik, A. Mangor-Jensen, I. Holmefjord // *Advances in Marine Biology*. – 1990. – Vol. 26. – P. 71–113. – [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60199-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60199-6)

Kjørsvik E. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) / E. Kjørsvik, K. Hoehne-Reitan, K. I. Reitan // *Aquaculture*. – 2003. – T. 227, iss. 1–4. – P. 9–20. – [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00492-7)

Kowalski, R. K. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors / R. K. Kowalski, B. I. Cejko // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 135. – P. 94–108. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>

Koya, Y. Ultrastructural observations on sperm penetration in the egg of elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*, showing internal gametic association / Y. Koya, K. Takano, H. Takahashi // *Zoological Science*. – 1993. – Vol. 10, iss. 1. – P. 93–101.

Kroll, M.-M. Paternal effects on early life history traits in Northwest Atlantic cod, *Gadus morhua* / M.-M. Kroll, M. A. Peck, I. A. E. Butts, E. A. Trippel // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2013. – Vol. 29, iss. 3. – P. 623–629. – <https://doi.org/10.1111/jai.12161>

Lahnsteiner, F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs / F. Lahnsteiner // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2000. – Vol. 23, iss. 2. – P. 107–118. – <https://doi.org/10.1023/A:1007839023540>

Lahnsteiner, F. The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae / F. Lahnsteiner // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2002. – Vol. 27, iss. 1. – P. 49–59. – <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000021792.97913.2e>

Lahnsteiner, F. First results on a relation between ovarian fluid and egg proteins of *Salmo trutta* and egg quality / F. Lahnsteiner // *Aquaculture Research*. – 2007. – Vol. 38, iss. 2. – P. 131–139. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01633.x>

Lanes, C. F. C. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks / C. F. C. Lanes, T. T. Bizuayehu, S. Bolla, C. Martins, J. M. de Oliveira Fernandes, Bianchini, A., V. Kiron, I. Babiak // *Aquaculture*. – 2012. – Vol. 324–325. – P. 267–275. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.036>

Li, X. Effect of flow velocity on the growth, stress and immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus*) in recirculating aquaculture systems / X. Li, L. Ji, L. Wu, X. Gao, X. Li, J. Li, Y. Liu // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2018. – Vol. 86. – P. 1169–1176. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.066>

Linhart, O. Ionic and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, *Acipenseriformes*) seminal fluid with motility parameters / O. Linhart, S. D. Mims, B. Gomelsky, A. E. Hiott, W. L. Shelton, J. Cosson, M. Rodina, D. Gela, J. Bastl // *Aquaculture International*. – 2003. – Vol. 11. – P. 357–368. – <https://doi.org/10.1023/A:1025773707439>

Liu, Y. A deep insight of spermatogenesis and hormone levels of aqua-cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) / Y. Liu, Q. Liu, S. Xu, Y. Wang, C. Feng, C. Zhao, Z. Song, J. Li // *Frontiers in Marine Science*. – 2021. – Vol. 7, art. no. 592880 (17 p.). – <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.592880>

Luquet, P. Interaction “nutrition-reproduction” in fish / P. Luquet, T. Watanabe // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 1986. – Vol. 2. – P. 121–129. – <https://doi.org/10.1007/BF02264080>

MacKenzie, B. R. Larval fish feeding and turbulence: a case for the downside / B. R. MacKenzie, T. Kiørboe // *Limnology and Oceanography*. – 2000. – Vol. 45, no. 1. – P. 1–10. – <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.1.0001>

Mangino, Jr. A. Combined effects of turbulence and salinity on growth, survival, and whole-body osmolality of larval southern flounder / Jr. A. Mangino, W. O. Watanabe // *Journal of the World Aquaculture Society*. – 2006. – Vol. 37, iss. 4. – P. 407–420. – <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00054.x>

Mylonas, C. C. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction / C. C. Mylonas, A. Fostier, S. Zanuy // *General and Comparative Endocrinology*. – 2010. – Vol. 165, iss. 3. – P. 516–534. – <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>

Nissling, A. Assessment of egg and larval viability in cod, *Gadus morhua*: methods and results from an experimental study / A. Nissling, R. Larsson, L. Vallin, K. Frohlunda // *Fisheries Research*. – 1998. – Vol. 38, iss. 2. – P. 169–186. – [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(98\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(98)00121-0)

Nissling, A. Effects of salinity and temperature conditions on the reproductive success of turbot (*Scophthalmus maximus*) in the Baltic Sea / A. Nissling, U. Johansson, M. Jacobsson // *Fisheries Research*. – 2006. – Vol. 80, iss. 2–3. – P. 230–238. – <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.04.005>

Ottesen, O. H. Parental effects on fertilization and hatching success and development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos and larvae / O. H. Ottesen, I. Babiak // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68, iss. 9. – P. 1219–1227. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.015>

Rideout, H. Spermatological characteristics of hatchery-reared Black Sea turbot (*Psetta maxima*) in spawning season / H. Rideout, A. T. Beken, İ. Aydın, E. Küçük // FABA 2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences / Ed. I. Aydın. – Trabzon, Turkey : CFRI Press, 2014. – P. 299. – <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24023.93607>

Rideout, R. M. Skipped spawning in female iteroparous fishes / R. M. Rideout, G. A. Rose, M. P. M. Burton // Fish and Fisheries. – 2005. – Vol. 6, iss. 1. – P. 50–72. – <https://doi.org/10.1111/j.1467-2679.2005.00174.x>

Rosengrave, P. A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon / P. Rosengrave, N. J. Gemmell, V. Metcalf, K. McBride, R. Montgomerie // Behavioral Ecology. – 2008. – Vol. 19, iss. 6. – P. 1179–1185. – <https://doi.org/10.1093/beheco/arn089>

Rosengrave, P. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits / P. Rosengrave, R. Taylor, R. Montgomerie, V. Metcalf, K. McBride, N. J. Gemmell // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2009. – Vol. 152, iss. 1. – P. 123–129. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.09.009>

Rurangwa, E. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish / E. Rurangwa, D. E. Kime, F. Ollevier, J. P. Nash // Aquaculture. – 2004. – Vol. 234, iss. 1–4. – P. 1–28. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>

Samaee, S. M. Embryo and larva development in common dentex (*Dentex dentex*), a pelagophil teleost: the quantitative composition of egg-free amino acids and their interrelations / S. M. Samaee, E. Mente, A. Estévez, G. Giménez, F. Lahnsteiner // Theriogenology. – 2010. – Vol. 73, iss. 7. – P. 909–919. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.017>

Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9, iss. 7. – P. 671–675. – <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Schreck, C. B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis / C. B. Schreck // *General and Comparative Endocrinology*. – 2010. – Vol. 165, iss. 3. – P. 549–556. – <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>

Stoss, J. 6: Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology / J. Stoss // *Fish Physiology*. Vol. 9: Reproduction. Part B: Behavior and Fertility Control. – London : Academic Press, 1983. – P. 305–350. – [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60306-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60306-4)

Stuurman, N. M. Mtrack2: multiple object tracker plugin for imageJ / N. M. Stuurman. – 2003.

Suquet, M. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*) / M. Suquet, M. H. Omnes, Y. Normant, C. Fauvel // *Aquaculture*. – 1992. – Vol. 101, iss. 1–2. – P. 177–185. – [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90241-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90241-C)

Suquet, M. Composition of the seminal Fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*) / M. Suquet, G. Dorange, N. H. Omnes, Y. Normant, A. Le Roux, C. Fauvel // *Journal of Fish Biology*. – 1993. – Vol. 42, iss. 4. – P. 509–516. – <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00355.x>

Suquet, M. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish specie / M. Suquet, R. Billard, J. Cosson // *Aquatic Living Resources*. – 1994. – Vol. 7, no. 4. – P. 283–294. – <https://doi.org/10.1051/alr:1994031>

Suquet, M. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact / M. Suquet, R. Billard, J. Cosson, Y. Normant, C. Fauvel // *Aquaculture*. – 1995. – Vol. 133, iss. 1. – P. 83–90. – [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00395-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00395-5)

Suquet, M. Seasonal variation of sperm quality in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) / M. Suquet, F. Malo, I. Quéau, D. Ratiskol, C. Quéré, J. Le Grand, C. Fauvel // *Aquaculture*. – 2016. – Vol. 464. – P. 638–641. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.016>

Tagawa, M. Entry of thyroid hormones into tilapia oocytes / M. Tagawa, C. L. Brown // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 129, iss. 2–3. – P. 605–611. – [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00352-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00352-9)

Tong, S. Stages of embryonic development and changes in enzyme activities in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) / S. Tong, H. Xu, Q. H. Liu, J. Li, Z. Z. Xiao, D. Y. Ma // *Aquaculture International*. – 2013. – Vol. 21, iss. 1. – P. 129–142. – <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9540-6>

Tong, X. Patterns of catabolic capacities and energy metabolism in developing embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) / X. Tong, L. Yang, X. Tang, X. Yang, C. Bao, J. Wang, Ye. Zhao, M. Tang // *Aquaculture*. – 2017. – Vol. 481. – P. 177–183. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.004>

Turan, C. Genetics structure analysis of turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) in the Black and Mediterranean seas for application of innovative management strategies / C. Turan, P. P. Ivanova, V. S. Raykov, M. Gurlek, D. Erguden, D. Yaglioglu, S. Karan, S. A. Dogdu, A. Uyan, B. Ozturk, V. Nikolov, I. Dobrovolov, A. Khanaychenko, V. E. Giragosov // *Frontiers in Marine Science*. – 2019. – Vol. 6, art. no. 740 (9 p.). – <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00740>

Urbach, D. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) / D. Urbach, I. Folstad, G. Rudolfson // *Behavioral Ecology and Sociobiology*. – 2005. – Vol. 57. – P. 438–444. – <https://doi.org/10.1007/s00265-004-0876-4>

Villamizar, N. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review / N. Villamizar, B. Blanco-Vives, H. Migaud, A. Davie, S. Carboni, F. J. Sánchez-Vázquez // *Aquaculture*. – 2011. – Vol. 315, iss. 1–2. – P. 86–94. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.036>

Ware, D. M. Relation between egg size, growth, and natural mortality of larval fish / D. M. Ware // *Journal of the Fisheries Board of Canada*. – 1975. – Vol. 32, no. 12. – P. 2503–2512. – <https://doi.org/10.1139/f75-288>

Wilson-Leedy, J. G. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters / J. G. Wil-

son-Leedy, R. L. Ingermann // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 67, iss. 3. – P. 661–672. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.003>

Wojtczak, M. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa / M. Wojtczak, G. J. Dietrich, M. Słowinska, S. Dobosz, H. Kuzminski, A. Ciereszko // *Aquaculture*. – 2007. – Vol. 270, iss. 1–4. – P. 259–264. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.010>

Yanagimachi, R. Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs / R. Yanagimachi, G. Cherr, T. Matsubara, T. Andoh, T. Harumi, C. Vines, M. Pillai, F. Griffin, H. Matsubara, T. Weatherby, K. Kaneshiro // *Biology of Reproduction*. – 2013. – Vol. 88, iss. 2. – Art. no. 47 (11 p.). – <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105072>

Zadmajid, V. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: A review / V. Zadmajid, J. N. Myers, S. R. Sørensen, I. A. E. Butts // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 132. – P. 144–152. – <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.021>