

Пров. 1980

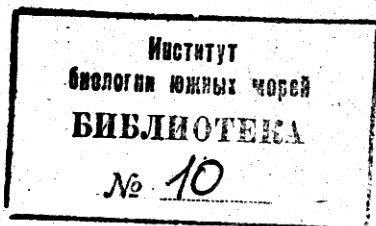
ПРОВ 98

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МОРСКОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ

Выпуск I

Черноморская камбала-калкан
Scophthalmus maoticus maoticus (Pallas)
как объект искусственного разведения



ИЗДАТЕЛЬСТВО « НАУКОВА ДУМКА »
КИЕВ - 1975

у гренландского или черного палтуса баренцевоморской популяции. - Тр. ПИРО, 1968, вып. 23.

14. Barr W.A. The endocrine control of the sexual cycle in the plaice *Pleuronectes platessa* (L.). III. The endocrine control of spermatogenesis. - Gen. Comp. Endocrinol., 1963, N 3.

15. Hoar W.S. Comparative physiology: hormones and reproduction in fish. - Ann. Rev. Physiol., 1965, vol. 27.

16. Pickford G.E. and Atz J.W. The Physiology of the Pituitary Gland of Fishes. - N.J. Zool. Soc. N.J., 1957.

17. Stanley H., Chieffi G. and Botte V. Histological and Histochemical Observation on the Testes of *Gobius paganellus*. - Zeitsch. Zellforsch., 1965, vol. 65.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОЗРЕВАНИЯ САМОК ЧЕРНОМОРСКОЙ
КАМБАЛЫ-КАЛКАНА (*SCORPNA LMUS MAEOTICUS PALLAS*)
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Н.К.Воробьева, М.Г.Таликина, А.П.Золотницкий
(АзЧерНИРО, Керчь)

Одна из исходных задач искусственного воспроизводства рыб - получение от них качественных зрелых половых продуктов. Для успешного решения этой задачи для черноморского калкана, необходимо всесторонне изучить процесс созревания и нереста этого вида как в природных, так и в экспериментальных условиях.

Некоторые особенности биологии размножения камбалы-калкана в море описаны в работах [2-7].

Мы специально исследовали завершающий период вителлогенеза и процесс созревания от желткового ооцита до зрелого овулировавшего яйца самок данного вида, содержащихся в экспериментальных условиях.

Работа выполнена на экспериментальной базе АзЧерНИРО в пос. Заветное в апреле-мае 1972 г. Производителей камбалы отлавливали донным тралом в районе Анапы и доставляли на базу за 8-12 ч в брезентовых ванночках (каждого в отдельной) размером 500x250 мм, специально сконструированных для этой цели В.Ф.Гнатченко. Такой способ транспортировки значительно снижал травмирование рыб при доставке. Воду в ванночках меняли через 4-6 ч. На базе рыбу содержали в бассейнах емкостью 2,5-3 м³ по три-пять экземпляров в каждом при температуре 12-14°C.

Наблюдение за созреванием ооцитов проводили методом прижизненного анализа щуповых проб, предложенным Апекиным [1]. От созревающих самок брали через 4 ч, начиная с момента доставки, щуповые пробы. Ооциты из проб исследовали бинокуляром при увеличении 7x8. Положение ядра в яйцеклетках определяли на срезах, приготовленных с помощью замораживающего микротсма. Для получения размерных характеристик клеточных компонентов ооцитов различного состояния пробы

фиксируют в жидкости Буэна, заливали парафином и обрабатывали по общепринятой методике. Срезы толщиной 5-7 мк окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну. Дополнительно по методу Лоури определяли содержание белка в ооцитах различных размерных групп. Всего проанализировано 180 щуповых проб, взятых от 27 самок камбалы-калканы IV-U и U стадий зрелости в возрасте 5-9 лет, гоносоматические индексы их колебались от 13 до 19%.

Прежде чем приступить к изучению созревания, необходимо было выявить признаки, по которым можно судить о ходе этого процесса. Для этого у самок IV стадии зрелости периодически через генипору извлекали щупом ооциты и просматривали их под бинокуляром. Всякий раз отмечали изменения, происходящие в ооцитах. Установлено, что в щуповых пробах, наряду с желтковыми ооцитами, встречаются яйцеклетки, размер которых по мере созревания увеличивается, усиливается степень гомогенизации желтка и изменяются количество и величина жировых капель. Используя эти признаки, а также результаты цитоморфологического анализа, мы проследили развитие яйцеклеток от желткового ооцита до зрелого овулировавшего яйца.

Желтковые ооциты в яичниках самок IV-U, U стадий зрелости разнородны не только по размеру, но и по внешнему виду. Наиболее мелкие из них (300-500 мк) - правильной округлой формы с желтком мелкозернистым. У большинства яйцеклеток отчетливо выделяется светлое пятно овальной формы, расположенное в центре (рис. 1, Ia). В центре клетки имеется круглое ядро, на периферии которого располагается в среднем 13 ядрышек. Вокруг ядра локализованы многочисленные жировые капельки, образующие характерное светлое кольцо, которое просматривается в живых ооцитах в виде светлого овального пятна. Гранулы желтка расположены относительно друг к другу в цитоплазме свободно. Периферический участок цитоплазмы образован крупными кортикальными вакуолями полисахаридной природы (ШЖ-реакция). Желтковые ооциты диаметром 500-630 мк отличаются от мелких отсутствием светлого пятна в центре клетки и отчетливо выраженной зернистой структурой желтка (рис. 1, Ib).

Из гистологических препаратов данных яйцеклеток (рис. 1, Ib) видно, что диаметр их ядра увеличивается (130 против 90 мк) и заметно возрастает количество желточных гранул. Они образуют довольно плотную массу, оттесняя периферические вакуоли к оболочке ооцита, и затемяют светлое кольцо жировых капелек вокруг ядра.

В яйцеклетках размером 630-700 мк обнаруживаются 15-20 мелких жировых капель. Структура желточных включений ооцитов - грубозернистая (рис. 1, Ic). На гистологических препаратах ооцитов этого

состояния изменений в положении ядра не наблюдается. Ядрышки по-прежнему располагаются вблизи ядерной мембраны. Жировые капли в результате их слияния укрупняются от 27 до 50 мк. Диаметр желточных гранул увеличивается вдвое и равен в среднем 27,2 мк. Гранулы желтка расположены в цитоплазме рыхло (рис. 1, Шб). Переход яйцеклеток в следующее состояние характеризуется некоторым увеличением их размеров (700-800 мк), значительным укрупнением жировых капель и уменьшением их количества до одной-четырех (рис. 1, IУа). Вследствие начавшегося процесса гомогенизации желтка содержимое яйцеклетки становится светлее.

Гистологический анализ ооцитов данного состояния свидетельствует о начале поляризации клетки. Ядро расположено эксцентрично (рис. 1, IУб). Количество ядрышек уменьшается в среднем до восьми. Размеры жировых капель увеличиваются до 60-105 мк. На препаратах видно, что гранулы желтка в результате их слияния продолжают увеличиваться. Диаметр их равен 37 мк. Увеличение диаметра ооцитов до 800-980 мк сопровождается окончательным слиянием жировых включений в одну каплю и интенсивно протекающей гомогенизацией желтка. В живых ооцитах желток представлен в виде крупных блестящих зерен. Яйцеклетки данного состояния внешне полупрозрачны (рис. 1, Уа).

Ядро находится на анимальном полюсе клетки вблизи собственной оболочки ооцита (рис. 1, Уб). Оно приобретает неправильные очертания. Количество ядрышек в нем уменьшается до четырех, диаметр их несколько увеличивается и равен 15 мк. Чаще всего ядрышки располагаются на периферических участках ядра. Цитоплазма - пенящая слабоокрашенная масса с незначительным количеством крупных гранул сильно вакуолизированного желтка.

Яйцеклетки размером 980-1100 мк становятся совершенно прозрачными, содержат одну жировую каплю (рис. 1, У1а). Ооциты в таком состоянии еще удерживаются в строме яичника. На гистологических препаратах ооцитов данного размера ядро как морфологическое образование не выявляется. Содержимое яйцеклеток представлено слабоокрашивающейся однородной цитоплазмой с крупной жировой каплей (256 мк) на периферии клетки (рис. 1, У1б).

Размеры овулировавших яиц камбалы-калкана 1100-1300 мк (рис. 1, У2а). Гистологическая картина их идентична описанной выше.

Приведенные данные визуального и гистологического анализа свидетельствуют о том, что процесс превращения желточного ооцита в зрелое овулировавшее яйцо характеризуется рядом последовательных, четко различающихся между собой состояний или фаз.

- Первая фаза. Мелкие желтковые ооциты со светлым овальной формы пятном в центре. Размер 300-500 мк.
- Вторая фаза. Крупные желтковые ооциты, желток уплотнен, светлое пятно отсутствует. Размер 500-630 мк.
- Третья фаза. Ооциты с 15-20 жировыми каплями. Размер 630-700 мк.
- Четвертая фаза. Ооциты с одной-четырьмя жировыми каплями. Размер 700-800 мк.
- Пятая фаза. "Полупрозрачный" ооцит. Размер 800-980 мк.
- Шестая фаза. "Прозрачный" ооцит, зрелое неовулировавшее яйцо. Размер 980-1100 мк.
- Седьмая фаза. Зрелое овулировавшее яйцо. Размер 1100-1300 мк.

Характеристики клеточных компонентов каждой фазы приведены в табл.1. Выделенные фазы охватывают два основных периода оогенеза: завершающий этап вителлогенеза и процесс созревания. Первые две фазы объединяют желтковые ооциты, находящиеся на различных этапах вителлогенеза. Третья фаза, вероятно, характеризует ооциты, завершившие этот процесс, т.е. яйцеклетки дефинитивного состояния. Об этом, с одной стороны, свидетельствует то, что в ооцитах этого состояния начинается формирование жировой капли и наблюдаются изменения агрегатного состояния цитоплазматических включений (увеличение почти в два раза размеров желточных гранул), (табл.1). С другой стороны, содержание белка в ооцитах третьей фазы достигает максимальной величины - 43,6 мкг на одну яйцеклетку - и сохраняется в этих пределах (41,9 - 42,2 мкг) в ооцитах последующих фаз, включая зрелые овулировавшие яйца размером 1100-1300 мк (табл.2).

Созревание яйцеклетки начинается с началом миграции ядра к анимальному полюсу - с четвертой фазы. Процесс миграции ядра довольно длителен, так как оно как морфологически обособленная структура выявляется еще в ооцитах пятой фазы, занимая в них полярное положение. Вероятно, с завершением гомогенизации желтка происходит и растворение зародышевого пузырька, поскольку на гистологических препаратах яйцеклеток шестой фазы ядро уже не обнаруживается.

Выделенные фазы развития ооцитов применены для анализа хода созревания самок камбалы-калкана преднерестового состояния. От самок, начиная с момента доставки или спустя некоторое время, брали через 4 ч щупом пробу, состоящую из 150-200 ооцитов, просматривали их под бинокляром, относя, в зависимости от степени выраженности признаков созревания, каждый ооцит к той или иной фазе. Вычисляли процентное соотношение ооцитов различных фаз в щуповой пробе.

Работа выполнена на четырех самках IV-V стадии зрелости. Первая

Таблица 1

Изменение клеточных компонентов в процессе роста и созревания ооцитов

Фаза	Диаметр ядра, мк	Диаметр ядрышек, мк		Количество ядрышек, шт.	Диаметр желточных гранул, мк		Диаметр жировых капель, мк		Количество жировых капель, шт.	Толщина оболочек, мк	n
		мелких	крупных		мелких	крупных	мелких	крупных			
I	96 \pm 1	6,9 \pm 0,2	10,1 \pm 0,5	13 \pm 0,9	6,5 \pm 0,5	10,1 \pm 0,6	12,2 \pm 0,9	26 \pm 3	58 \pm 5	10,9 \pm 0,6	7
II	130 \pm 4	7,1 \pm 0,4	11,1 \pm 0,8	11 \pm 0,9	5,5 \pm 0,7	13,5 \pm 0,5	16,9 \pm 2,4	27,5 \pm 4	56 \pm 3	12,9 \pm 0,8	9
III	131 \pm 3	7,8 \pm 0,5	12,2 \pm 0,5	12 \pm 1,2	-	27,2 \pm 1,7	26,0 \pm 1,3	50 \pm 3	20 \pm 1	16,5 \pm 0,8	13
IV	132 \pm 4	10,2 \pm 0,7	15,1 \pm 0,8	8 \pm 0,8	19,7 \pm 1,9	37,1 \pm 1,5	59,7 \pm 4,1	125 \pm 6	4 \pm 0,6	13,8 \pm 0,6	13
У	149 \pm 5	-	14,7 \pm 1,3	4 \pm 0,5	-	-	-	185 \pm 9	1	9,3 \pm 0,7	13
УI	-	-	-	-	-	-	-	236 \pm 4	1	4,9 \pm 0,5	13
УII	-	-	-	-	-	-	-	236 \pm 4	1	4,9 \pm 0,5	8

Примечание: *M* - средняя, *m* - ошибка выборочной средней, *n* - количество определений.

Т а б л и ц а 2

Количество белка (в мкг на одну яйцеклетку) в ооцитах различных фаз

Фаза	Размер, мк	К о л и ч е с т в о		
		белка, мкг	проц [*]	
I	350-500	21,6	+ 3,4	4
II	500-630	31,8	± 1,4	5
III	630-700	43,6	± 2,3	4
IV	700-800	42,2	± 1,3	4
V	800-900	42,0	± 1,4	4
VI	900-1100	41,9	± 0,5	4
УП	1100-1300	42,2	- 1,0	4

* Каждая проба состояла из 30 ооцитов указанной размерной группы.

подопытная самка доставлена 6 мая и помещена в экспериментальный аквариум с температурой воды 12°C. Температура во время опыта не изменялась. 7 мая, через 16 ч после доставки, от этой самки было отцежено небольшое количество (35 тыс. икринок) зрелой икры. В щуповой пробе, взятой в этот момент, обнаружены ооциты трех состояний и 13,5% яйцеклеток четвертой фазы - завершения формирования жировой капли. Желтковые ооциты и яйцеклетки дефинитивного состояния в последующих щуповых пробах встречались постоянно, но так как нас в первую очередь интересовали созревающие клетки, на рис. 2 изображено изменение процентного соотношения за период наблюдения ооцитов последних четырех фаз. График показывает, что через 26 ч с момента доставки в щуповых пробах появляются ооциты пятой фазы. Количество ооцитов четвертого состояния начинает уменьшаться. Максимального значения (более 30%) число ооцитов пятого состояния достигает спустя 32 ч. В последующие часы в пробах появляются ооциты шестой фазы - зрелые неовулировавшие яйца, количество которых сохраняется примерно на одном уровне (11-15%) 16 ч. На 56-й ч наблюдения оно несколько повышается (до 21%). Зрелая овулировавшая икра была отцежена от этой самки первый раз через 40, второй - через 60 ч.

Таким образом, период полового созревания одной порции икры подопытной самки довольно длителен (около 60 ч), что обусловлено некоторой растянутостью шестой фазы, которая происходит, вероятно, вследствие задержки процесса овуляции, так как некоторое количество зрелой икры проявляется уже спустя 40 ч от начала наблюдения (см. рис. 2). Ооциты четвертой фазы (завершения формирования жировой капли и начала поляризации яйцеклетки) в щуповых пробах начинают

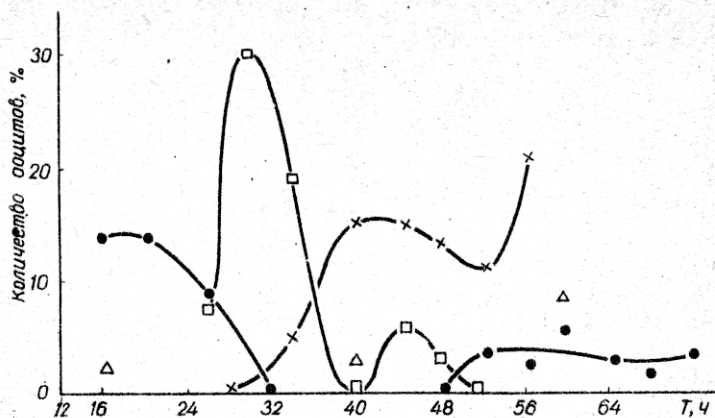


Рис.2. Ход созревания ооцитов подопытной самки № 1:

● - количество ооцитов III фазы; ■ - IV фазы; X - V фазы;
▲ - количество ооцитов VI фазы.

появляться вновь через 48 ч наблюдения. Незначительное их количество (3-5%) встречается вплоть до 92 ч наблюдения, однако дальнейшего их движения не происходит. Созревание ооцитов на этой фазе останавливается, далее они подвергаются дегенерации. Наблюдение за состоянием гонад этой самки проводили 109 ч и были прерваны из-за гибели подопытной рыбы.

Вторая подопытная самка доставлена на базу 13 мая. Температура воды в аквариуме, где она содержалась, в течение всего периода наблюдения была около 13°C. В момент доставки от этой самки отцежено около 350 тыс. икринок. В шуповой пробе встречались, наряду с ооцитами первых трех состояний, около 20% клеток четвертой фазы и единичные яйцеклетки шестой и седьмой фаз - неовулировавшие и овулировавшие яйца. Максимальное количество (30%) ооцитов фазы завершения формирования жировой капли обнаруживается в шуповых пробах через 8 ч после начала наблюдения. Затем оно снижается до 15-17% и сохраняется в этих пределах на протяжении длительного периода, значительно уменьшаясь после 36 ч (рис. 3). Постепенное возрастание количества полупрозрачных ооцитов (пятая фаза) начинается с момента доставки и достигает максимального значения спустя 20 ч. Увеличение числа яиц шестого состояния (зрелой неовулировавшей икры) происходит также постепенно. Они начинают выявляться в шуповых пробах через 8 ч наблю-

дения и достигают наибольшего количества через 32 ч. Овуляция созревшей икры происходит через 36 ч, в этот момент зрелые яйца составляют около 50% щуповой пробы. Незначительное количество яйцеклеток седьмой фазы, которое встречается в более ранних щуповых пробах, относится, по-видимому, к предыдущей порции, не выведенной полностью из полости яичника. Следовательно, созревание новой порции икры у данной подопытной самки длится приблизительно 36 ч, продолжительность отдельных фаз - около 12 ч (см. рис.3).

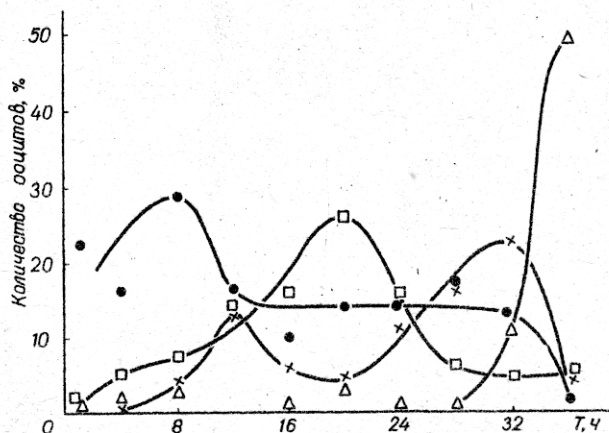


Рис.3. Ход созревания ооцитов подопытной самки № 2. Обозначения те же, что и на рис.2.

Процесс формирования одной порции икры прослежен еще у двух самок. Обе рыбы доставлены 13 мая и содержались в аквариумах при тех же условиях, что и вторая подопытная самка. Овуляция вновь созревшей икры у третьей рыбы произошла через 40, а у четвертой - через 36 ч после начала наблюдения. Процесс созревания ооцитов у этих двух особей сходен с двумя первыми.

Общая продолжительность процесса созревания ооцитов очередной порции, исследованного у четырех самок камбалы-калкана в экспериментальных условиях, составляет 36-60 ч, длительность отдельных фаз 8-24 ч и зависит, по-видимому, как от условий доставки и содержания, так и от исходного физиологического состояния рыб.

Овуляция созревшей икры у калькана представляет довольно быст-

рый процесс. По-видимому, почти вся созревшая порция икры овулирует одновременно. Об этом, с одной стороны, свидетельствует тот факт, что значительное количество овулировавшей икры в щуповых пробах встречается в очень узком интервале времени (см. рис. 2, 3). С другой стороны, самки камбалы-калкана, вероятно, из-за отсутствия необходимых условий, в экспериментальном аквариуме не нерестятся. Зрелую икру обычно отцеживали легким поглаживанием брюшка рыбы в области расположения гонад. Таким образом от подопытных самок удавалось получить от 100 до 500 тыс. икринок. Значительное количество отцеживаемой икры также заставляет предполагать, что овуляция ее осуществляется одновременно.

Пробы зрелой икры, полученной от первой и третьей подопытных самок, осеменяли спермой, взятой от содержавшихся совместно с самками самцов. Оплодотворенность проб, определенная на стадии многоклеточной морулы, составляла 90-93%. Если учесть, что наиболее высокий процент оплодотворения, который удалось получить при осеменении икры рыб, выловленных камбальными сетями не превышал 95%, то можно предположить, что икра созревших в экспериментальных условиях самок была доброкачественной.

Проследить ход созревания последующей порции икры не удалось, поскольку одна из подопытных рыб погибла через несколько часов после овуляции. У трех других, несмотря на появление в щуповых пробах ооцитов, фазы завершения формирования жировой капли, дальнейшего превращения этих яйцеклеток не происходило. Самки в таком состоянии пребывали длительное время (2-3 суток), затем в яичниках появлялись ооциты с признаками дегенерации, что было подтверждено и гистологическим анализом.

Выяснение причин остановки процесса созревания ооцитов камбалы-калкана в экспериментальных условиях - задача дальнейших исследований. Полученные данные представляют интерес с точки зрения использования их для оценки степени созревания интактных и стимулированных самок.

В ы в о д ы

1. Методом прижизненного анализа щуповых проб в яичниках самок IV-V стадии зрелости выделены критерии созревания яйцеклеток. Основными визуальными признаками созревания являются гомогенизация желтка и гидратация клетки, слияние жировых капель.

2. Использование выделенных критериев позволило выявить семь последовательных состояний (фаз) в процессе превращения желткового ооцита в зрелое овулировавшее яйцо.

3. На основании гистофизиологического и биохимического анализа получены предварительные данные, характеризующие дефинитивное состояние осцита (размер 600-650 мк, жировых капель 15-20 шт., содержание белка 43 мкг на яйцеклетку).

4. Дан предварительный анализ хода созревания одной порции икры у самок преднерестового состояния. Показано, что длительность созревания очередной порции икры составляет 36-60 ч.

5. Полученные данные будут использованы для оценки степени созревания интактных и стимулированных самок.

Л и т е р а т у р а

1. Апекин В.С., Тронина Т.М. Опыты по стимулированию созревания и нереста кефалей. - Гидробиол. журн., 1972, т.8, № 1.

2. Виноградов К.А., Ткачева К.С. Материалы по плодовитости рыб Черного моря. - Труды Карадагской биол. ст., 1950, вып. 9.

3. Калинина Э.М. Особенности порционного икротетания черноморского калкана *Scorpthalmus maeoticus* Pall. - Вопросы ихтиологии, 1960, вып. 16.

4. Овен Л.С. Половые циклы и характер икротетания черноморских рыб. - В кн.: Размножение и экология массовых рыб Черного моря на ранних стадиях онтогенеза. "Наукова думка", К., 1970.

5. Попова В.П. Распределение камбалы в Черном море. - Тр. ВНИРО, 1954, т.28.

6. Попова В.П. Об искусственном разведении черноморской камбалы-калкана. - Рыбное хоз-во, 1969, № 5.

7. Смирнов А.И. Порционность икротетания пелагофильных рыб Черного моря. - ДАН СССР, 1950, т. 70, № 1.

ВОПРОСЫ ЦИТОГЕНЕТИКИ КАМБАЛЫ-КАЛКАНА В СВЯЗИ С ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЕЕ ИСКУССТВЕННОГО РАЗВЕДЕНИЯ

В.Н.Иванов

(ИнБЮМ АН УССР, Севастополь)

Среди задач практической цитогенетики черноморского калкана первоочередными следует признать следующие.

1. Кариологическая характеристика *Scorpthalmus maeoticus maeoticus* Pallas (определение количества, описание морфологии хромосом).

2. Исследование изменчивости хромосомного комплекса.

3. Применение цитогенетического анализа для оценки качества производителей, икринок на различных стадиях развития, предличинки и личинок.

Интересно также сравнить хромосомные наборы всех представителей *Pleurocentriforinae* Азово-Черноморского бассейна и выяснить кариологические возможности их гибридизации.

Нами исследовались хромосомные комплексы черноморской камбалы-калкана в клетках эмбрионов и предличинки. Икра, полученная от од-