

АКВАКУЛЬТУРА

УДК 639.3.034:639.371.2.03

О.П. Филиппова, С.В. Пьянова, С.Е. Зуевский*

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии, 107140, г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

**ВЛИЯНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ МНОГОКРАТНОГО
ПРИЖИЗНЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ИКРЫ ОТ ГИБРИДОВ
ОСЕТРОВЫХ РЫБ НА ИХ ООГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ
ЗАМКНУТОГО ЦИКЛА ВЫРАЩИВАНИЯ (УЗВ)**

Приведены данные динамики изменений цитоморфологических характеристик ооцитов в яичниках двух гибридов осетровых рыб. Экспериментальные исследования проводились в 2010–2012 гг. на производителях породы бестера «Бурцевская» (*Huso huso* (Linnaeus) x *Acipenser ruthenus* (Linnaeus)) и «Аксайская» (*Acipenser ruthenus* x (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*)) в контролируемых условиях аквариального комплекса в Москве, в России. При организации исследований применяли методы прижизненного получения икры, ультразвуковой диагностики, биопсии с использованием щупа, анестезии и гистологический анализ. Строение оболочек ооцитов чистых видов осетровых и описанных нами гибридов аналогично, но толщина оболочек и сроки их появления на отдельных стадиях зрелости несколько различны. Полученные результаты позволят по толщине оболочек ооцитов отличать икру бестера от икры других осетровых рыб. Установлено, что средняя продолжительность межнерестового интервала у гибридов, выращенных в условиях замкнутого цикла водообеспечения, при температуре воды 20–21 °С составила 10–12 мес.

Ключевые слова: осетровые рыбы, бестер, замкнутая система водообеспечения, контролируемые условия, созревание, ооциты, оболочки.

Filippova O.P., Piyanova S.V., Zuevsky S.E. Influence of repeated intravital extraction of eggs from sturgeon hybrids on their oogenesis under conditions of recirculation aquaculture system // *Izv. TINRO*. — 2015. — Vol. 181. — P. 191–203.

Dynamics of cytomorphological characteristics of oocytes in ovaries is considered for two sturgeon hybrids: besters of the breed Burtlevskaya *Huso huso* (Linnaeus) x *Acipenser ruthenus* (Linnaeus) and the breed Aksayskaya *Acipenser ruthenus* x (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*) on the experimental data obtained under controlled conditions in the aquatic complex in Moscow (Russia) in 2010–2012. Methods of intravital eggs extraction, ultrasound diagnostics, biopsy with the probe, anesthesia and histological analysis are applied. Structure of membrane is similar for straight sturgeon species and hybrids, but the membrane thickness and the term of its emergence on certain maturity stage are somewhat different, so the eggs of bester could be distinguished by the oocyte membrane thickness. Mean interspawning interval for the hybrids in conditions of recirculation aquaculture system at water temperature 20–21 °С is determined as 10–12 months.

Key words: sturgeon, bester, recirculation aquaculture system, controlled conditions, maturation, oocyte, membrane.

* Филиппова Ольга Павловна, старший научный сотрудник, e-mail: maricul@vniro.ru; Пьянова Светлана Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: pjanova@vniro.ru; Зуевский Сергей Евгеньевич, ведущий инженер, e-mail: maricul@vniro.ru.

Filippova Olga P., senior researcher, e-mail: maricul@vniro.ru; Piyanova Svetlana V., Ph.D., leading researcher, e-mail: pjanova@vniro.ru; Zuevsky Sergey E., leading engineer, e-mail: maricul@vniro.ru.

Введение

Бестер является одним из наиболее распространенных осетровых гибридов, выращиваемых в условиях аквакультуры для производства чёрной икры (Burtsev, 1997). Известно, что работы по изучению структуры икры осетровых начали проводиться более 50 лет назад и продолжаются до сих пор. В то же время структура оболочек ооцитов изучалась на диких видах осетровых (Садов, 1963; Воробьева, Марков, 1999; Zelazowska, 2010), а современные аквакультурные исследования осетровых относятся к размерам ооцитов, ядер и микропиле (Hurvitz et al., 2007; Лабенец, Новосадова, 2010; Микодина, Новосадова, 2011). Большинство исследований на икре осетровых посвящены рыбам из естественной среды обитания. Зрелые ооциты осетровых достаточно крупные: например, диаметр ооцитов зеленого осетра *Acipenser medirostris* (Ayres) составляет 4,2–4,5 мм (Eenennaam et al., 2006), яйцеклетки каспийской белуги имеют диаметр в диапазоне 3,6–4,3 мм (Pirogovskii et al., 1989). Средние диаметры ооцитов белуги из дельты Дуная составляют 3,61–4,18 мм (Lenhardt et al., 2005), из российских рек — 3,60–4,00 мм (Dettlaff et al., 1993), средние диаметры ооцитов стерляди — 1,90–2,50 мм (Dettlaff et al., 1993) и 2,10–2,40 мм (Lenhardt et al., 2005). Ооциты имеют оболочки не клеточного строения — это основная, или первичная, оболочка *zona radiata* и вторичная оболочка — хорион, которая служит для прикрепления икры к субстрату с помощью клейких ворсинок (табл. 1). Толщина клеточных мембран (эпителиальной, сосудистой и фолликулярной) незначительна, и они не увеличиваются в размерах от начальной стадии образования желтка в ооците до овуляции. Сосудистая оболочка снабжает ооцит питательными веществами, фолликулярная оболочка выполняет трофическую функцию.

Таблица 1
Толщина структурных слоев оболочек ооцитов в яичниках самок IV стадии зрелости чистых видов осетровых (Садов, 1963), мкм

Table 1
Thickness of structural layers of oocyte membrane in ovaries of sturgeon female at maturity stage IV from natural population, μm (from: Садов, 1963)

Вид	Общая	Вторичная (хорион)	Первичная (<i>zona radiata</i>)
Белуга мартовского хода	111,62	54,97	56,65
Белуга октябрьского хода	96,66	48,33	43,31
Осетр волжский	70,31	45,0	25,31
Осетр куринский	89,94	38,32	51,61
Стерлядь	39,98	20,0	19,98
Севрюга куринская	68,27	51,61	16,66
Севрюга волжская	63,30	26,65	36,65
Зелёный осётр*	–	42,0	–
Белый осётр*	–	115,0	–

* По Eenennaam с соавторами (2008).

Толщина клеточных оболочек не превышает для эпителиальной — 1,5–2,0 мкм, сосудистой — 2,3 и фолликулярной — 3,0–3,3 мкм. Увеличение толщины оболочек в ооцитах является результатом роста хориона и *zona radiata*.

В настоящее время наиболее прогрессивная технология в аквакультуре — содержание объектов в установке с замкнутым циклом водообеспечения (УЗВ). Она позволяет оптимизировать процесс роста рыбы в автономных климатических условиях и сократить сроки созревания (Проскуренко, 2003; Филиппова и др., 2010, 2012; Жигин, 2011). Успех инкубации осетровых в искусственных условиях в значительной степени зависит от состояния оболочек их ооцитов. Аспекты изменения структуры толщины оболочек ооцитов осетровых видов не были изучены в деталях. Процессы и динамика созревания оболочек ооцитов еще не исследованы на осетровых, выращенных в аквакультуре. Научные данные по изменениям цитологических характеристик ооцитов в процессе роста у гибридов осетровых рыб на примере бестера отрывочны (Филиппова и др., 2010).

Цель данной работы — определить динамику изменений цитологических характеристик в ооцитах яичников двух гибридов осетровых рыб: бестера (гибрид самки белуги *Huso huso* (Linnaeus) и самца стерляди *Acipenser ruthenus* (Linnaeus)) — БС — и гибрида самки стерляди и самца бестера (С х БС), а также проанализировать продолжительность отдельных стадий зрелости в контролируемых условиях в межнерестовый интервал.

Материалы и методы

Объект и условия культивирования

Объектом исследования были самки, находящиеся в межнерестовом интервале после первого нереста. Осетровые рыбы содержались до возраста 5 и 6 лет в бассейнах площадью 3 м³ с замкнутой системой водообеспечения во Всероссийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО, г. Москва, Россия). Температура воды в зимовальный период составляла 4–6 °С, а в остальной период средняя температура воды, поддерживаемая за счёт системы отопления в помещении, не превышала 20–21 °С. Из-за отсутствия нагревательных элементов температуру воды нельзя было повысить. Рыбу кормили искусственными кормами европейского производства фирмы Le Gouessant (Франция) и выращивали в пресной воде, поставляемой из центральной водопроводной сети г. Москва. Гидрохимические параметры сыграли отрицательную роль в сроках первого созревания — отмечалось превышение ПДК нитритов и нитратов. Все рыбы, участвующие в эксперименте, были индивидуально помечены электронными метками для удобства отдельных наблюдений.

Рыбы переводились в зимовальный бассейн с температурой воды 4–6 °С с начала IV завершённой стадии зрелости гонад с коэффициентом поляризации ооцита 10–19 %. Для определения пола и стадии зрелости рыбы мы применяли ультразвуковую диагностику. Для этого использовали линейно-конвексный компьютерный портативный сканер Aloka SSD-500 (Япония). Затем каждые 2 мес. мы брали кусочки гонад методом биопсии с помощью шупа (Методические указания ..., 1999) и определяли коэффициент поляризации ооцитов. В эксперименте участвовало 44 экз. БС и 39 экз. С х БС. Для полного биологического анализа проведено вскрытие 14 экз. БС и 9 экз. С х БС (табл. 2).

Коэффициент поляризации ооцитов рассчитывался по формуле

$$\text{КП} = \frac{\text{расстояние от верхней границы зародышевого пузырька до оболочек ооцита в области анимального полюса}}{\text{расстояние от анимального полюса до вегетативного}} * 100.$$

Мы использовали гвоздичное масло *Hřebíčková silice* производства фирмы «Kulih» (Чешская Республика, Hradec Kralove). Применяли 2-минутную экспозицию для каждой рыбы (гвоздичное масло 0,04 мл/л) в 500-литровой ёмкости, затем рыбу пересаживали и промывали в чистой воде от 10 до 15 мин (Руководство ..., 2011). После прижизненного получения икры и щуповых проб все рыбы оставались в живых. Общую длину тела измеряли до конца средних лучей хвостового плавника (Крылова, Соколов, 1981). Коэффициент упитанности по Фултону (Кф) рассчитывали по формуле

$$\text{Кф} = \frac{\text{масса рыбы, г} * 100}{\text{длина, см}}.$$

При гормональной стимуляции внутримышечно, ближе к голове, шприцем вводился раствор сурфагона (5 мкг/кг массы рыбы). Сурфагон — синтетический нанапептид, аналог гонадотропин-релизинг гормона ЛГ-РГ-люлиберина. Сурфагон выпускают в виде стерильного раствора в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия с консервантом нипагином (ЗАО Мосагролек или ЦЛВРЗ-ЭНТ, г. Санкт-Петербург, Россия). Содержание сурфагона — 5 или 10 мкг в 1 мл. Аналог гонадотропин-релизинг гормона стимулирует выделение гонадотропинов (лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона) гипофиза, что в свою очередь приводит к стимуляции созревания фолликулов и овуляции. Использовали двукратные инъекции (первая вводится из расчета 1/10 части от общего количества препарата на одну рыбу, вторая — через 12 ч из расчета 9/10) (Гончаров, 1984).

Таблица 2

Биологические и репродуктивные показатели самок-производительниц бестера при содержании в управляемых условиях

Table 2

Biological and reproductive parameters of matured bester females rearing under controlled conditions

Гибрид	Масса рыбы, кг	l_1^* , см	Масса гонад, г	К зрелости, %	Кф, %	Стадия зрелости
БС	4,4	91	54,5	1,2	0,6	II
БС	10,6	102	455,5	4,3	1,0	II–III
БС	9,5	103	898,0	9,5	0,9	III
БС	4,9	89	456,0	9,3	0,7	III
БС	5,6	85	542,0	9,7	0,9	IV незаверш.
БС	6,0	90	758,0	12,6	0,8	IV незаверш.
БС	6,0	88	835,0	13,9	0,9	IV незаверш.
БС	5,4	92	1047,0	19,4	0,7	IV незаверш.
БС	3,2	70	584,0	18,3	0,9	IV незаверш.
БС	8,6	98	1113,0	12,9	0,9	IV заверш.
БС	3,7	71	420,0	11,4	1,0	IV заверш.
БС	6,6	85	1100,0	16,7	1,1	IV заверш.
БС	5,0	94	828,0	16,6	0,6	IV заверш.
БС	4,4	87	707,5	16,1	0,7	IV заверш.
С х БС	1,8	62	25,0	1,4	0,8	II
С х БС	2,0	60	35,0	1,8	0,9	II
С х БС	3,1	75	306,0	9,9	0,7	II–III
С х БС	2,4	65	247,0	10,3	0,9	III
С х БС	2,5	66	318,0	12,7	0,9	III
С х БС	2,6	62	447,0	17,2	1,1	IV незаверш.
С х БС	2,5	66	418,5	16,7	0,9	IV заверш.
С х БС	2,0	61	401,5	20,1	0,9	IV заверш.
С х БС	2,6	65	358,0	13,8	0,9	IV заверш.

* Длина тела до конца средних лучей хвостового плавника (Крылова, Соколов, 1981).

Гистологический анализ

Образцы гонад были собраны и зафиксированы для анализа в межнерестовый период перед вторым нерестом. Все измерения ооцитов и их оболочек предварительно проведены на свежих икринках, полученных методом биопсии, и те же клеточные структуры были измерены после стандартной гистологической обработки (Гистология для ихтиологов ..., 2009) с использованием светового микроскопа и фотоаппарата Leica DC 100 (Германия). Гистологическая обработка материалов, зафиксированных 10 %-ным раствором параформальдегида была сделана через процессор Microm SNP-120 (Германия). Заливка в парафин осуществлена с использованием заливочной станции ES-350. Срезы толщиной 5 мкм были получены на микротоме Microm HM 440E и окрашены гематоксилином Эрлиха и эозином.

Фотографии были получены при увеличении окуляра 10х и объективов: 5, 10, 20, 40 и 100х. Гистологическое определение стадий зрелости половых желез проводилось по шкале, предложенной Е.В. Серебряковой (1964) для межнерестового интервала. Согласно гистологической обработке, на разных стадиях развития яичников были выделены 5 групп ооцитов, названные согласно современной европейской систематике: превителлогенные, белые ооциты, желтые, серые и черные ооциты (Linares-Casenave et al., 2003; Hurvitz et al., 2007). Диаметры ооцитов, их ядра и толщина оболочек были измерены с помощью программы Image-J. Для расчета диаметров яйцеклеток мы использовали коэффициент сжатия клеток после гистологической обработки 0,25 (Сайфуллин, 1980; Воронина, 1981). Средний диаметр ооцитов (min и max диаметры) рассчитывали для каждой рыбы после измерения 25 крупных ооцитов на срезах, используя статистический анализ Microsoft Excel программного обеспечения.

Проведена статистическая обработка данных. Значение $P < 0,05$ (критерий Стьюдента) было статистически достоверным.

Результаты и их обсуждение

Биологические данные

Исследованные самки БС первый раз созрели в возрасте 60 мес., самки С х БС — в возрасте 48 мес., включая 3-месячное содержание в холодной воде перед созреванием.

Размерно-массовые характеристики самок варьировали: длина от 60 до 103 см; масса — от 1,8 до 10,6 кг; средний коэффициент поляризации ооцитов на стадии II — 0,8 %, на стадии II–III — 0,9, на стадии III — 0,8, на IV незавершённой — 0,9 и завершённой IV — 0,9 %. Возраст БС на II стадии зрелости — 65 мес., на стадии II–III — 68, на III — 71, на незавершённой IV — 73, на IV завершённой — 75 мес. Возраст С х БС на стадии II — 52 мес., на стадии II–III — 55, на III — 57, на незавершённой IV — 59, на IV завершённой — 61 мес.

Цитологические данные

Мы исследовали процесс повторного созревания самок от начала II до IV завершённой стадии.

Этапы созревания яичников бестера в межнерестовый период

Стадия VI–II. Присутствуют многочисленные резорбирующиеся клетки и редуцированные остатки фолликулов. В основном отмечаются ооциты однослойного фолликула диаметром 0,2–0,3 мм (табл. 3), но также есть и ооциты, в которых период малого роста полностью завершен, в начале вителлогенеза, диаметром 0,45 мм. Для яичников повторно созревающих рыб существуют некоторые особенности. В яичниках на этой стадии присутствуют ооциты всех переходных фаз от оогоний до ооцитов в начале трофоплазматического роста.

Стадия II. Ооциты находятся в периоде цитоплазматического (превителлогенного) роста. Средний диаметр ооцитов в фазе однослойного фолликула составляет 0,12–0,20 мм для С х БС и 0,30–0,40 мм для БС. Ядерно-плазменное отношение достигает 32 % для С х БС (рис. 1, А) и 23 % для БС (рис. 1, Б). Многочисленные ядрышки разбросаны по всему объему кариоплазмы, но крупные формируются у ядерной оболочки. В начале этой стадии все липидные отложения располагаются по периферии цитоплазмы ооцита.

Стадия II–III. Ооциты на стадии образования околядерного желтка. В оболочках увеличивается слой *zona radiata*. Для бестера в ооцитах диаметром 0,8 мм еще не сформирован внутренний слой *zona radiata interna*. В цитоплазме ооцитов имеются три кольца отложения желтка (рис. 1, В): периферийное, среднее и перинуклеарное. Периферическое кольцо — самое узкое. В конце стадии незаполненным желтком остаются зоны, примыкающие к оболочкам ооцита и ядра. Продолжают наблюдаться ооциты цитоплазматического роста и оогонии. В ооцитах С х БС с тем же диаметром (см. табл. 2) *zona radiata* состоит из двух слоев, соответственно появляется *zona radiata interna* (рис. 1, Г).

Стадия III. Доминируют вителлогенные ооциты в фазе пигментации. Их диаметр составляет 1,6 мм (рис. 1, Д). Вся плазма заполняется желтком. Пигментный слой образуется под самой оболочкой ооцита. В ядре множество мелких ядрышек, концентрирующихся под хорошо видимой ядерной оболочкой. В начале этой стадии в ооцитах полностью сформированы все оболочки. *Zona radiata* имеет два слоя (*interna* и *externa*) (рис. 1, Е).

Стадия IV незавершенная. Все оболочки ясно видны, их толщина становится максимальной (рис. 1, Ж, З). Преобладают крупные ооциты со средним диаметром 1,94 мм (от 1,53 до 2,36 мм). Происходят изменения в форме клеток, они становятся овальными. В начале этого этапа ядро начинает смещаться от центра клетки к полюсу.

Средние цитоморфологические показатели ооцитов самок БС и С х БС на различных стадиях зрелости, содержащихся в условиях УЗВ

Table 3

Mean cytomorphological parameters of oocytes in ovaries of bester females at certain stages of maturity rearing under conditions of recirculation aquaculture system

Вид рыбы	Стадия зрелости	Цитоморфологические показатели ооцитов			Толщина оболочек, мкм		
		Диаметр ооцита, мкм	Диаметр ядра, мкм	ЯПО, %	Общая	Вторичная (хорион)	Первичная (zona radiata)
БС	II	$393,0 \pm 14,09$ 227–493	$91,52 \pm 4,30$ 66–115	23,3	$7,80 \pm 0,08$ 3–10	–	–
	II–III	$859,0 \pm 133,83$ 342–1560	$161,54 \pm 27,29$ 55,78–294,0	18,8	$22,10 \pm 1,65$ 12–25	–	–
	III	$1688,0 \pm 185,82$ 786–2271	$367,80 \pm 48,86$ 242,5–454,5	21,5	$48,90 \pm 1,16^*$ 43,95–53,28	$22,40 \pm 1,35$ 18,2–27,2	$27,90 \pm 1,16$ 22,54–31,87
	IV незаверш.	$2317,0 \pm 135,33^*$ 1705–2674	$364,95 \pm 20,24^*$ 306,72–419,24	16,0	$58,20 \pm 1,67^*$ 47,83–67,88	$28,6 \pm 1,3^*$ 21,33–39,0	$31,90 \pm 1,19^*$ 24,15–39,80
	IV заверш.	$2600,0 \pm 139,82^*$ 2288–2938	$387,23 \pm 24,09^*$ 340,43–446,28	15,1	$71,80 \pm 2,17^*$ 62,70–85,06	$33,0 \pm 1,73^*$ 26,6–38,9	$36,40 \pm 1,58^*$ 30,30–45,45
С х БС	II	$159,0 \pm 8,5$ 66–220	$50,11 \pm 2,69$ 30,0–73,5	32,2	$1,90 \pm 0,13$ 1,13–2,75	–	–
	II–III	$895,0 \pm 22,0$ 728–1020	$191,88 \pm 14,70$ 145,0–253,75	21,0	$15,9 \pm 1,4$ 10,0–26,25	$7,4 \pm 0,3$ 6,25–8,75	$7,42 \pm 0,70$ 3,75–13,75
	III	$1345,0 \pm 197,85$ 1135–1825	$348,03 \pm 17,48$ 304,84–396,40	24,3	$46,40 \pm 1,69^*$ 30,87–51,64	$18,20 \pm 0,65$ 11,95–23,85	$23,90 \pm 0,89$ 17,25–34,45
	IV незаверш.	$1939,0 \pm 130,65^*$ 1535–2360	$334,61 \pm 71,32^*$ 263,29–405,93	17,3	$46,60 \pm 1,47^*$ 39,74–54,0	$20,50 \pm 2,17^*$ 10,5–39,9	$30,70 \pm 1,82^*$ 20,68–39,10
	IV заверш.	$2265,0 \pm 176,12^*$ 1792–2784	$370,62 \pm 19,80^*$ 325,88–417,30	16,4	$69,0 \pm 2,29^*$ 50,74–69,60	$27,50 \pm 1,59^*$ 20,12–35,87	$39,0 \pm 1,73^*$ 28,78–49,20

Примечание. Над чертой — среднее \pm стандартная ошибка среднего, под чертой — пределы (минимум и максимум); ЯПО — ядерно-плазменное отношение.

* Достоверность различий величин при $p < 0,05$.

Ядрышки многочисленны, и на протяжении стадии они концентрируются под оболочкой ядра (рис. 1, И). В конце этапа они отходят от оболочки ядра и расположены по всему объему нуклеоплазмы. На этом этапе, его также называют «стадией серых ооцитов» (Linares-Casenave et al., 2003; Hurvitz et al., 2007), в оболочках С х БС уже видны микропиле (рис. 1, К). В конце этой стадии в ядрах крупных ооцитов С х БС наибольшее количество ядрышек локализовано в центре ядра (рис. 1, Л). В ооцитах БС ядрышки разбросаны по всей кариоплазме и ещё не сгруппированы.

Стадия IV завершённая. Доминируют зрелые ооциты при среднем диаметре 2,75 мм (от 2,45 до 3,05 мм). Ядро мигрирует к анимальному полюсу, переходя из зоны крупнозернистого желтка в зону мелкозернистого. Хромосомы и ядрышки находятся в центре ядра, образуя кариосферу. Цитоплазма наполнена шарообразными глыбками желтка, ясно видны микропиле. В конце стадии ядрышки начинают растворяться, образуя светлые альвеолки. Непосредственно перед овуляцией ядерная оболочка яйцеклетки лизируется, нуклеоплазма выходит в цитоплазму (рис. 1, М).

Степень сжатия ооцитов осетровых рыб после гистологической обработки материала

Коэффициент сжатия проверялся после гистологического анализа измеренных нами параметров: диаметров ооцитов, их ядер и толщины оболочек (табл. 3). Мы измерили диаметр икринок, извлечённых методом биопсии до фиксации, а затем тех же ооцитов после гистологической обработки. Было установлено, что диаметры цитоплазмы ооцитов уменьшаются на 25 %, а ядро ооцитов и оболочки характеризуются меньшей гидратацией благодаря более плотной структуре и не меняют толщину.

Оболочки яйцеклеток осетровых

Структура оболочек созревающих ооцитов — многослойная. На стадиях зрелости III и IV в оболочках сформированы вторичная студенистая (хорион) и первичная радиальная оболочка (*zona radiata*) — *externa* и *interna*. Самая внешняя — наружная эпителиальная оболочка, под ней расположена тонким слоем сосудистая, под ней лежит оболочка с зернистой структурой — фолликулярная, она примыкает к вторичной студенистой оболочке (хориону), а затем идёт первичная оболочка (*zona radiata*), разделенная на две части: внешнюю *externa* и внутреннюю *interna*, непосредственно прилегающую к цитоплазме. Изменения общей толщины всех оболочек, хориона и *zona radiata* у двух гибридов — БС и С х БС — показаны на рис. 2.

У БС и С х БС показатели толщины ооцитов и их оболочек на IV стадии зрелости яичников занимают среднее положение между таковыми белуги и стерляди из природных популяций (см. табл. 1). Осетровые характеризуются синхронным развитием ооцитов. В ооцитах трофоплазматического роста есть только небольшая асинхронность в начале этого периода, но она быстро сглаживается.

Динамика ядерно-плазменного отношения в ооцитах осетровых

Постоянная температура выращивания 20–21 °С вызывает определенные особенности оогенеза. В яичниках на стадии II–III диаметр ооцитов резко увеличивается, рост ядра задерживается. В условиях УЗВ наблюдается аналогичное явление, но на стадии III отмечается незначительное повышение ядерно-плазменного отношения. В естественных сезонных условиях выращивания с ежегодным зимним периодом процессы созревания и роста ооцита происходят плавно, а ядерно-плазменное отношение постепенно уменьшается от начала отложения желтка. Тем не менее ядро ооцита продолжает расти до начала IV завершенной стадии зрелости как в естественной среде, так и в аквакультуре (табл. 3).

Оценка стадий зрелости в межнерестовом интервале

Продолжительность периода между нерестами зависит от многих факторов: температуры, освещенности, кормления, гидрохимических параметров, площадей для выращивания рыбы и др., но очень важным среди них является температура содержания рыбы. Для бестера обеих пород межнерестовый интервал при содержании в прудах ЗАО «Казачка» Ростовской области составлял 2–4 года, т.е. от 24 до 48 мес. В тепловодном садковом хозяйстве при Череповецкой ГРЭС АО РТФ «Диана» он сокращается до 2 лет. На тепловодных рыбоводных фермах в Республике Корея в системе оборотного водоснабжения и УЗВ этот период для самок С х БС и БС составлял 1–2 года (Запороженко и др., 2007).

Планомерное взятие и анализ щуповых проб из яичников двух гибридов позволили определить продолжительность отдельных стадий зрелости в межнерестовый период, который в среднем составил 13 мес. для С х БС (от 9 до 16 мес.), а для БС — 15 мес. (от 13 до 18 мес.) при постоянной температуре выращивания 20–21 °С, включая период зимовки 3 мес. в зимовальном бассейне при температуре 4–6 °С. Данные по длительности отдельных этапов перед вторым созреванием для самок бестера приведены в табл. 4.

Таблица 4

Продолжительность стадий зрелости яичников самок осетровых гибридов в контролируемых условиях, мес.

Table 4

Duration of the ovaries maturity stages for sturgeon hybrids under controlled conditions, month

Самки	Стадия зрелости							МИ, мес.
	VI	VI–II	II	II–III	III	IV незаверш.	IV заверш.	
	Температура содержания, °С							
	20–21						4–6	
С х БС	1	1	4	1	2	1	3	13
БС	1,0	1,0	5,0	1,0	2,5	1,5	3,0	15

Примечание. МИ — межнерестовый интервал.

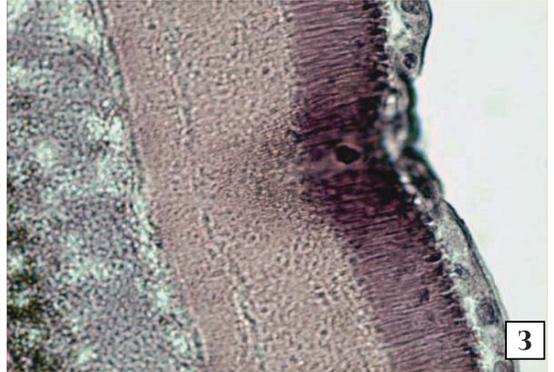
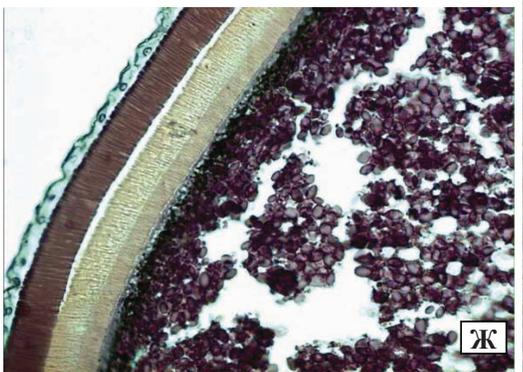
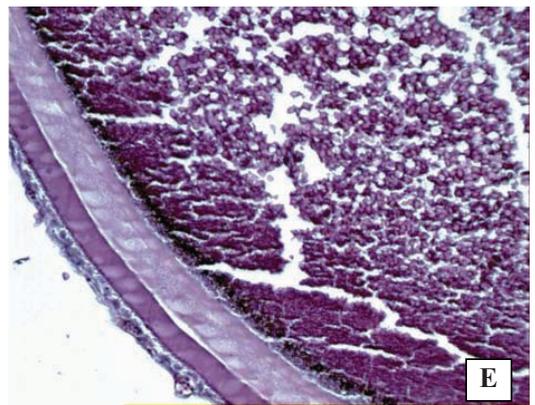
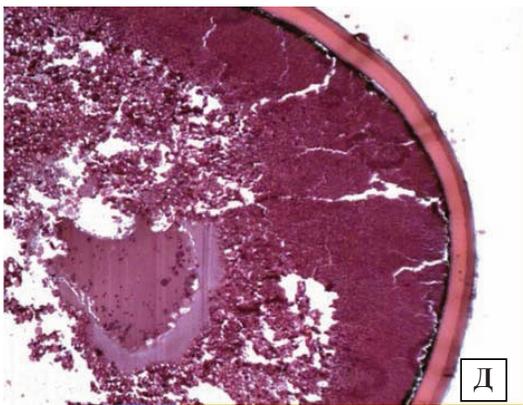
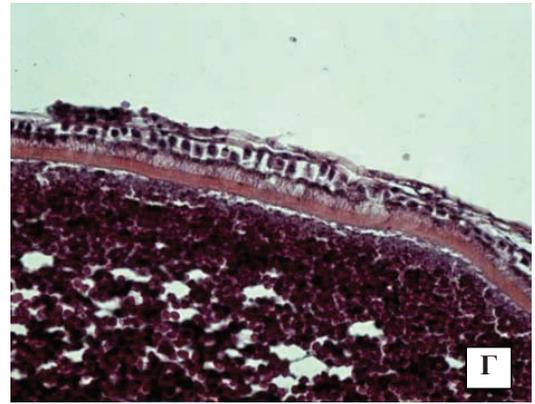
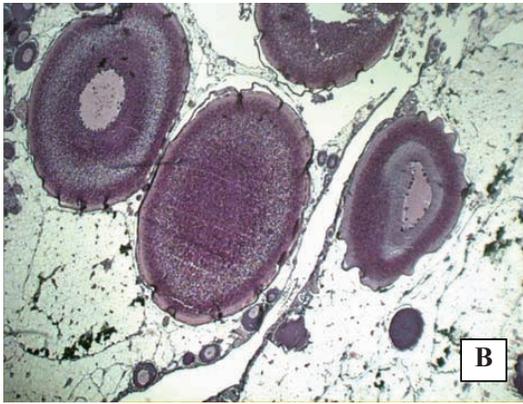
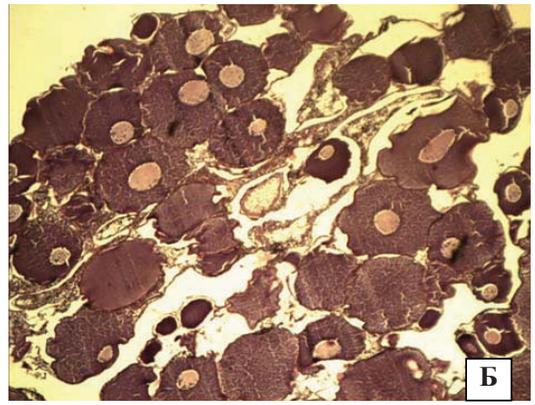
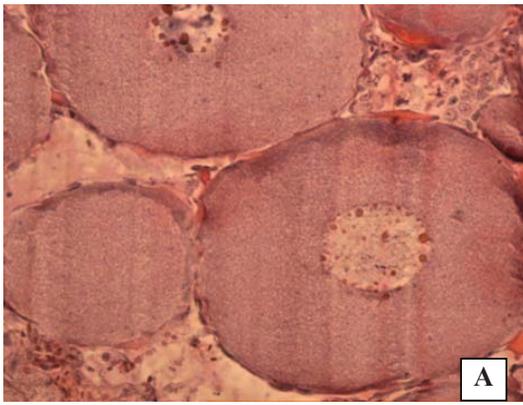


Рис. 1.

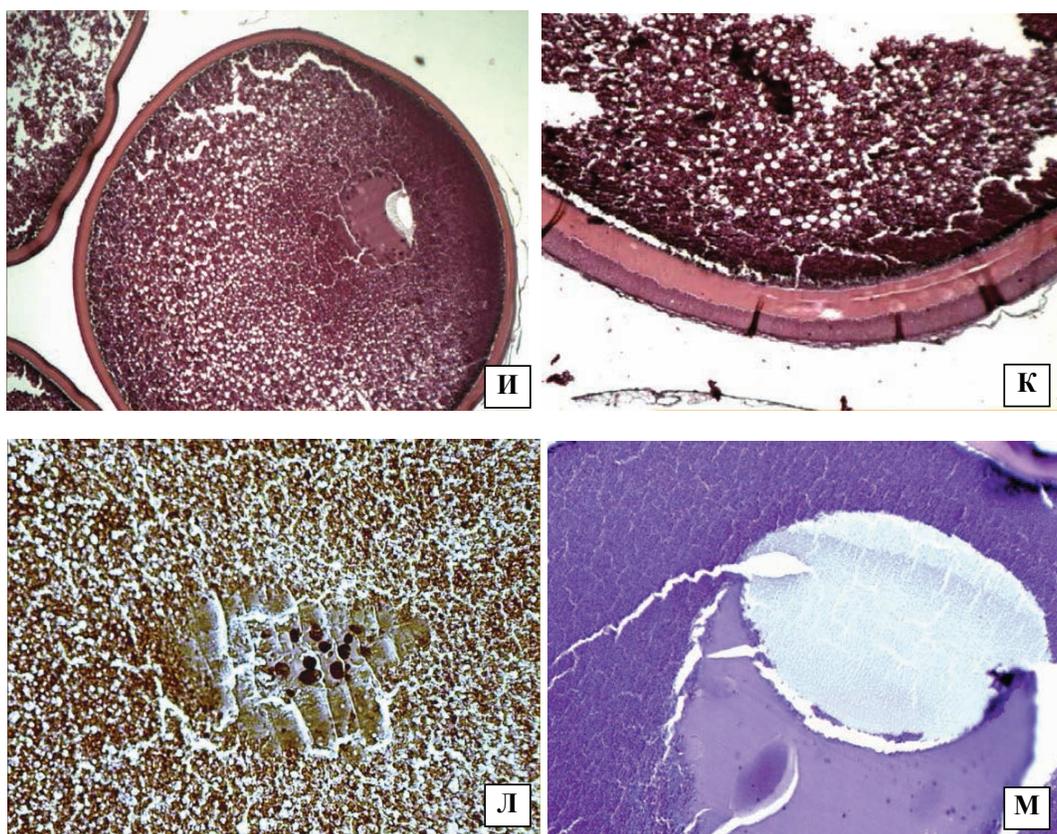


Рис. 1. Микроструктура яичников бестера различных стадий зрелости; увеличение 10 x 5 (Б, В, И), 10 x 10 (Д); 10 x 20 (К, Л, М), 10 x 40 (А, Г, Е, Ж) и 10 x 100 (З): А, Б — стадия II, начало цитоплазматического роста, С x БС и БС; В — стадия II–III (ооциты в стадии накопления желтка), яйцеклетка диаметром 0,8 мм на этапе формирования перинуклеарной зоны желтка и превителлогенные ооциты малого роста, БС; Г — разделение *zona radiata* на 2 слоя и появление *zona radiata interna*, С x БС; Д — конец III стадии зрелости (желтые ооциты), яйцеклетка диаметром 1,6 мм, БС; Е — сформирована *zona radiata interna*, БС; Ж — незавершенная IV стадия (серые ооциты, поздняя стадия вителлогенеза), оболочки яйцеклетки, БС; З — закончившие рост оболочки яйцеклетки завершённой IV стадии и микропиле, С x БС; И — IV завершённая стадия, закончившее рост ядро переходит в зону мелкозернистого желтка; К — С x БС, оболочки и микропиле IV незавершённой стадии; Л — ядро со сформированными в центре ядрышками, С x БС; М — БС, завершённая IV стадия (стадия черных ооцитов), ядро достигло анимального полюса, ядрышки не видны

Fig. 1. Microstructure of biter ovaries at certain maturity stages: А, Б — stage II, beginning of cytoplasmatic growth (S x BS and BS); В — stage II–III (yolk deposition), vitellogenic oocyte of the diameter 0.8 mm at the phase of perinuclear yolk formation and small pre-vitellogenous oocytes (BS); Г — *zona radiata* division onto 2 layers and appearance of *zona radiata interna* (S x BS); Д — late stage III (yellow oocytes), oocyte of the diameter 1.6 mm (BS); Е — complete formation of *zona radiata interna* (BS); Ж — unfinished stage IV (gray oocytes, late vitellogenesis), oocyte membrane (BS); З — membranes of fully-grown oocytes at stage IV with micropyle (S x BS); И — finished stage IV, nucleus of fully-grown oocyte enters the zone of fine yolk (S x BS); К — finished stage IV, membranes and micropyles (S x BS); Л — nucleus with nucleoluses formed in the center (S x BS); М — finished stage IV (black oocytes), nucleus reached the animal pole, nucleoluses aren't visible (BS). Magnification: 10 x 5 (Б, В, И), 10 x 10 (Д); 10 x 20 (К, Л, М), 10 x 40 (А, Г, Е, Ж), and 10 x 100 (З)

Варьирование в сроках созревания в сходных условиях зависело от генетической индивидуальности самок. Как и при первом созревании, существенный диапазон в колебаниях приходился на II стадию зрелости. Существенно меньшим колебаниям при постоянной температуре были подвержены стадии VI и VI–II. Продолжительность стадий III и IV практически была стабильной. Продолжительность последних стадий

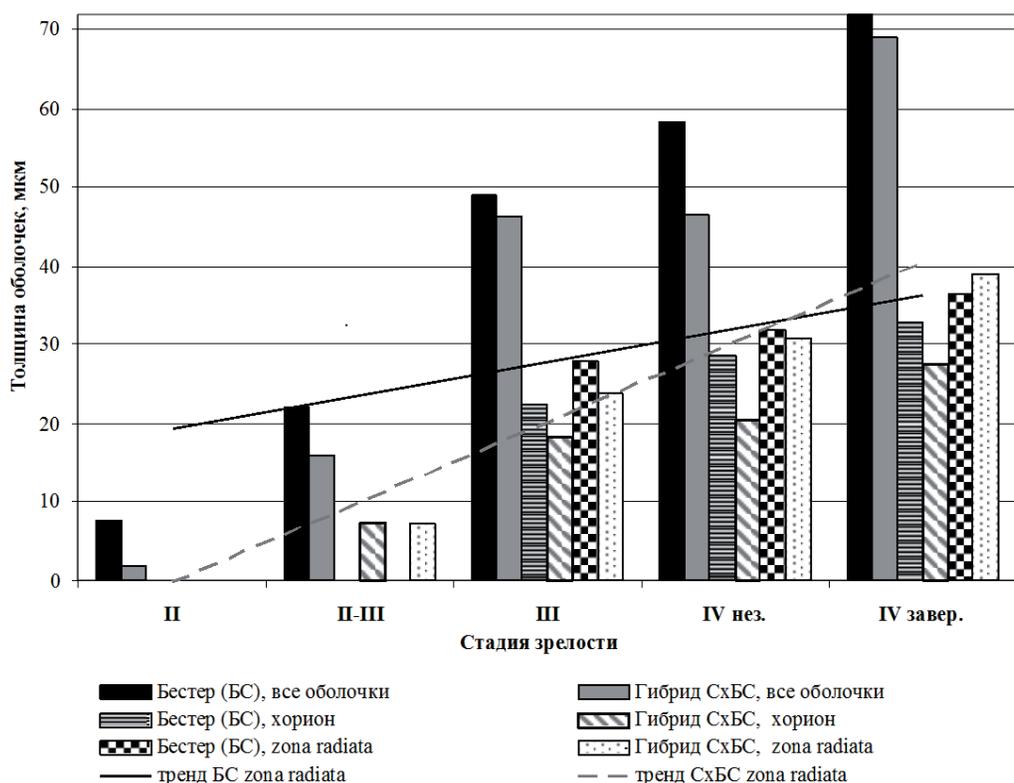


Рис. 2. Изменение общей толщины ооцита у двух осетровых гибридов
 Fig. 2. Change of total thickness of the oocyte membrane for two sturgeon hybrids

созревания, как правило, при выращивании в УЗВ менялась только в зависимости от температуры воды (Филиппова и др., 2012). Распределение повторно созревающих самок по величине межнерестового интервала отражено в табл. 5.

Таблица 5
 Распределение повторно созревающих самок в зависимости от продолжительности межнерестового интервала

Table 5
 Number of repeatedly maturing females by duration of interspawning interval

Самки	Межнерестовый интервал, мес.										Всего
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
С х BC	1	2	2	9	11	8	4	2	–	–	39
BC	–	–	–	–	6	8	16	10	2	2	44

Возникновение любых отклонений в структуре и толщине оболочек и диаметре ооцитов бестера свидетельствует о нарушении условий культивирования рыб в тепловодной аквакультуре. Условия нашего экспериментального выращивания стали благоприятными для поддержания высокого уровня оплодотворяемости ооцитов бестера (Филиппова и др., 2010). Выращивание при постоянной температуре 20–21 °С не вызывает нарушений в процессе созревания бестера. Межнерестовый интервал при оптимальной температуре для роста обоих гибридов (22–24 °С) и содержания в бассейнах площадью 9 м³ сокращается до 10,5 и 12,0 мес. соответственно для С х BC и BC, включая период зимнего содержания (Филиппова и др., 2014). В аквакультуре от гибридов бестера можно неоднократно прижизненно получать икру на пищевую и косметическую продукцию, а также жизнеспособное потомство для формирования маточных стад. У ленского осетра *Acipenser baerii* наблюдалось ухудшение качества икры после 5-го прижизненного получения. Поэтому в настоящее время рекомендуется на 6-е созревание забивать самок с получением икры, хотя в прудовых условиях

у самок бестера не наблюдалось ухудшения качества икры ни на 8-, ни на 12-й раз созревания (Nikolaev et al., 2009).

Методы биопсии и гистологическое исследование — успешные и эффективные методы определения различных стадий зрелости осетровых и их гибридов. Все рыбы остаются живыми и здоровыми. Важно, что точность процедуры биопсии возрастает с увеличением возраста и размера рыбы.

Гистологический анализ осетровых показал, что самки в возрасте 5 и 6 лет находились на превителлогенных и вителлогенных стадиях зрелости после первого созревания. Были измерены ооциты цитоплазматического и трофоплазматического роста, определены размеры ооцитов, при которых появляется *zona radiata interna*. У обоих гибридов средний диаметр ооцитов в яичниках увеличивается в 5 раз от начала отложения желтка до завершения перемещения ядра к анимальному полюсу. У двух гибридов осетровых имеются различия в диаметре зрелых ооцитов: зародышевые клетки БС на 14,8 % больше, чем такие же С х БС. Мы не выявили никаких нарушений в ядерной оболочке ооцитов вителлогенного роста. Ядерно-плазменное отношение снижается от стадии III к IV у С х БС на 8,0 %, а у БС — на 6,4 %.

Структура и толщина оболочек ооцитов гибридов согласуются с физиологической нормой, а общая толщина оболочек ооцитов занимает среднее положение между обоими родителями (белугой и стерлядью). При созревании оболочек ооцитов увеличение их толщины происходит из-за неравномерного утолщения хориона и первичной оболочки.

В оболочках яйцеклеток у гибридов были отмечены различия в росте основных слоев. В общем в процессе созревания оболочки ооцитов из двух гибридов увеличиваются от 2–7 до 69–72 мкм (Piyanova et al., 2013). От стадии II к III стадии толщина оболочек в среднем для С х БС увеличилась в 27 раз, а для БС — в 7 раз. В то же время толщина оболочек при переходе к завершённой IV стадии (стадия черных ооцитов) увеличивается только в 1,3–1,5 раза.

Не было найдено никаких существенных различий в структуре цитоплазмы и ядра на разных стадиях зрелости у двух гибридов бестера. *Zona radiata interna* формируется раньше в ооцитах С х БС, затем в ооцитах БС. Толщина оболочек у БС возрастает в большей степени за счёт хориона, а не *zona radiata*.

Известно, что оболочки сохраняют сферообразную форму яйцеклетки, что делает возможным дифференциацию и развитие её частей. Фолликулярная оболочка имеет трофическую функцию. Появление аномалий в структуре ооцитов и толщины оболочек может отражать плохие условия выращивания рыбы в тепловодной аквакультуре. Кроме того, оболочки имеют жизненно важное значение для защиты яйца от бактериального загрязнения, особенно *saprolegnia*. Снижение толщины оболочек может привести к возможным аномалиям, повышающим восприимчивость к бактериальным заболеваниям и даже грозящим гибелью эмбриону. Если толщина оболочек ооцитов выше среднего уровня, это может препятствовать нормальному кислородному обмену в икринках и проникновению сперматозоидов через микропиле. Во время оплодотворения это может привести к гибели клеток. Нарушение оболочек не клеточной структуры икры осетровых рыб препятствует липкости икринок на IV завершённой стадии зрелости и защитной функции и зависит от условий выращивания созревающей рыбы, а также своевременного исследования созревающих гамет рыб обоих полов.

Таким образом, в результате исследования выяснены основные цитологические особенности в динамике развития ооцитов гибридов осетровых в аквакультуре.

Заключение

Искусственное разведение плодовых гибридов бестера выгодно, о чём свидетельствуют полученные первые данные о межнерестовом периоде и отдельных его стадиях от первого до второго созревания самок бестера в контролируемых условиях с рециркуляционной системой водообеспечения.

Известно, что цитологические показатели ооцитов осетровых являются систематическими видовыми показателями их происхождения. Полученные результаты по

толщине оболочек и диаметру ооцитов гибридов бестера могут использоваться как критерий при экспертизе товарной икорной продукции на предмет фальсификации. Сведения о структуре и толщине оболочек ооцитов бестера могут быть использованы при написании технических характеристик «Пастеризованная зернистая икра осетровых рыб» (ГОСТ 7442-2002; ГОСТ 6052-2004).

Исследование было проведено в рамках государственного контракта ВНИРО № 7-01 с Федеральным агентством по рыболовству (г. Москва, Россия). Мы благодарим сотрудников лаборатории нормативного и технологического развития аквакультуры ВНИРО за многостороннюю помощь в реализации экспериментальной работы в аквариальном комплексе. Также мы благодарны профессору Харальду Розенталю (Harald Rosenthal, Germany), главному редактору «J. of Applied Ichthyology» (Журнал прикладной ихтиологии), президенту Всемирного общества сохранения осетров, за ценные замечания и рекомендации при подготовке рукописи.

Список литературы

- Воробьева Э.И., Марков К.П.** Ультраструктурные особенности икры у представителей *Acipenseridae* в связи с биологией размножения и филогенией // *Вопр. ихтиол.* — 1999. — Т. 39, № 2. — С. 197–209.
- Воронина Э.А.** Состояние яичников лобана *Mugil cephalis* L. в период нерестовой миграции // *Эколого-физиологические основы аквакультуры на Черном море.* — М. : ОНТИ ВНИРО, 1981. — С. 21–23.
- Гистология для ихтиологов: опыт и советы** : моногр. / Е.В. Микодина, М.А. Седова, Д.А. Чмилевский и др. — М. : ВНИРО, 2009. — 112 с.
- Гончаров Б.Ф.** Синтетический аналог люлиберина — новый перспективный стимулятор созревания половых продуктов осетровых рыб // *ДАН СССР.* — 1984. — Т. 276. — С. 1002–1006.
- Жигин А.В.** Замкнутые системы в аквакультуре : моногр. — М. : ВНИРО, 2011. — 664 с.
- Запорожченко Н.С., Зуевский С.Е., Филиппова О.П.** Созревание и межнерестовый интервал у осетровых рыб при выращивании в замкнутых и полузамкнутых установках в Республике Корея // *Рациональное использование пресноводных экосистем — перспективное направление реализации национального проекта «Развитие АПК»* : мат-лы Междунар. науч.-практ. конф. — М. : Россельхозакадемия, 2007. — С. 255–259.
- Крылова В.Д., Соколов Л.И.** Морфологические исследования осетровых рыб и их гибридов : методич. рек. — М. : ВНИРО, 1981. — 49 с.
- Лабенец А.В., Новосадова А.В.** Морфометрические и некоторые ультраструктурные особенности икры русского осетра, продуцируемой при полноциклическом выращивании // *Актуальные проблемы современной науки и образования* : мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. — Уфа : РИЦ БашГУ, 2010. — Т. 2. — С. 368–372.
- Методические указания по прижизненному получению икры у осетровых рыб** / И.А. Бурцев, А.И. Николаев, А.С. Сафронов и др. — М. : ВНИРО, 1999. — 10 с.
- Микодина Е.В., Новосадова А.В.** Строение зрелых ооцитов сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* // *Докл. РАН.* — 2011. — Т. 440, № 4. — С. 557–560.
- Проскуренко И.В.** Замкнутые рыбоводные установки : моногр. — М. : ВНИРО, 2003. — 152 с.
- Руководство по применению анестетика «гвоздичное масло» в аквакультуре** / Е.В. Микодина, М.А. Седова, С.В. Пьянова и др. — М. : ВНИРО, 2011. — 64 с. (Сер. Аквакультура, вып. 6.)
- Садов И.А.** Строение и формирование оболочек яиц осетровых и некоторых представителей костистых рыб // *Тр. Ин-та морфологии животных им. А.Н. Северцова.* — 1963. — Вып. 38. — С. 110–188.
- Сайфуллин Р.Р.** Особенности полового созревания стерляди в условиях Куйбышевского водохранилища // *Вопр. ихтиол.* — 1980. — Т. 20, № 5. — С. 842–848.
- Серебрякова Е.В.** Исследование гонад производителей осетра Волгоградского водохранилища // *Тр. ВНИРО.* — 1964. — Т. 56. — С. 117–130.
- Филиппова О.П., Бурцев И.А., Сафронов А.С. и др.** Влияние температурных условий выращивания бестера (*Acipenser nkoljukini*) на длительность гаметогенеза и возраст достижения половой зрелости в установках замкнутого водообеспечения и в прудах // *Тр. ВНИРО.* — 2010. — Т. 148. — С. 170–179.

Филиппова О.П., Сафронов А.С., Зуевский С.Е., Дудин К.В. Влияние продолжительности межнерестового интервала на продукционные характеристики производителей гибридов белуги *Huso huso* L. и стерляди *Acipenser ruthenus* L. // Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России : мат-лы Междунар. науч. конф. — Ростов н/Д : ЮНЦ РАН, 2014. — С. 37–42.

Филиппова О.П., Сафронов А.С., Зуевский С.Е., Дудин К.В. Особенности половых циклов самок бестера *Acipenser ruthenus* × (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) Аксайской породы при содержании в установке с замкнутым циклом водообеспечения // Вопр. рыб-ва. — 2012. — Т. 13, № 2(50). — С. 396–410.

Burtsev I.A. Bester in aquaculture // Sturgeon Stoks and Caviar Trade Workshop / eds V.J. Birstein, A. Bauer, A. Kaiser-Pohlmann. — Switzerland and Cambridge, 1997. — P. 35–43.

Dettlaff T.A., Ginzburg A.S., Schmalhgauzen O.I. Sturgeons fishes: development biology and aquaculture. — B. : Springer-Verlag, 1993. — 300 p.

Eenennaam V.J.P., Linares J., Doroshov S.I. Reproductive conditions of the Klamath River green sturgeon // Trans. Am. Fish. Soc. — 2006. — Vol. 135, № 1. — P. 151–163.

Eenennaam V.J.P., Linares-Casenave J., Muguet J.-B., Doroshov S.I. Induced spawning, artificial fertilization, and egg incubation techniques for Green sturgeon // Aquaculture. — 2008. — Vol. 70, Iss. 4. — P. 434–445.

Hurvitz A., Jackson K., Degani G., Levavi-Sivan B. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture // Aquaculture. — 2007. — Vol. 270, № 1–4. — P. 158–166.

Lenhardt M., Nigel Finn R., Cacic P. et al. Analysis of the post-vitellogenic oocytes of three species of Danubian Acipenseridae // Belg. J. Zool. — 2005. — Vol. 135, № 2. — P. 205–207.

Linares-Casenave J., Kroll K.J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon // Aquaculture. — 2003. — Vol. 221, № 1–4. — P. 645–656.

Nikolaev A.I., Andrianov D.P., Burtsev I.A. et al. International trade in caviar and business perspectives in Russia // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons (Fish & Fisheries). — 2009. — Vol. 29. — P. 321–337.

Pirogovskii M.I., Sokolov L.I., Vasil'ev V.P. *Huso huso* (Linnaeus, 1758) // The freshwater fishes of Europe / ed. J. Holčík. — Wiesbaden : AULA-Verlag, 1989. — Vol. 1, pt 2. — P. 156–200.

Piyanova S., Filippova O., Zuevskiy S. Dynamics of changes in cytological characteristics of bester oocytes under controlled conditions // Workshop DIFA II (Diversification in inland finfish aquaculture). — Vodnany, Czech Republic : Univ. of South Bohemia, 2013. — P. 34.

Zelazowska M. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae) // J. Fish. Biol. — 2010. — Vol. 76. — P. 694–706.

Поступила в редакцию 19.12.14 г.