

© Е.В. ЕФРЕМОВА, А.Г. СЕЛЮКОВ, Л.А. ШУМАН

katerinaef@yandex.ru

УДК 597:57.017.642:576.35

**ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПОЛА И ФОРМИРОВАНИЯ
ФОНДА ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ МУКСУНА
COREGONUS MUKSUN (PALLAS)**

АННОТАЦИЯ. У мальков и сеголеток муксуна исследовали гамето- и гонадогенез. Показано, что даже в благоприятных условиях нагула при быстром темпе соматического развития дифференцировка пола и формирование фонда половых клеток у муксуна очень низкие. Полученные данные обсуждаются в контексте гибридного происхождения вида.

SUMMARY. Gameto- and gonadogenesis in the fries and underyearlings of mucksun have been explored. It was shown, that sex differentiation and formation of pool of sexual cells in mucksun is very low even in favorable condition of fattening at fast rate of somatic development. The received data are discussed in the context of hybrid origin of this species.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Сиговые рыбы, муксун, дифференцировка пола, фонд половых клеток, природная гибридизация.

KEY WORDS. Whitefish, mucksun, sex differentiation, pool of sexual cells, natural hybridization.

Надежность функционирования воспроизводительной системы рыб закладывается в раннем онтогенезе [1]. Имеющиеся данные о дифференцировке пола и формировании фонда половых клеток ограничены немногочисленными видами, преимущественно экспериментальными или экономически важными — данио-рерио, медака, лососевые, осетровые и некоторые другие [2], [3], [4], [5] и др. У такой крупной группы рыб, как сиговые, он исследован фрагментарно [6], [7], [8], [9], [10].

Среди сиговых рыб Оби одним из наиболее ценных видов является муксун. Этот эндемичный вид России отличается продолжительным жизненным циклом и сравнительно поздним половым созреванием, что в условиях современной антропогенной нагрузки существенно ограничивает его репродукционный потенциал [11], [12]. Темп гаметогенеза и сроки полового созревания в значительной степени обусловлены характером протекания ранних этапов онтогенеза. Между тем детальных гистофизиологических исследований формирования репродуктивной системы у муксуна в течение первого года жизни прежде не проводилось. Предпринятое ранее исследование формирования фонда первичных гонацитов в эмбриогенезе этого вида [13] было продолжено изучением особенностей гонадо- и гаметогенеза в постэмбриональный период.

Цель работы заключалась в исследовании особенностей дифференцировки пола и начальных этапов формирования фонда половых клеток у муксуна в контролируемых условиях.

Материал и методы. Двухнедельные личинки муксуна в мае 2009 г. были доставлены из Тобольского инкубационного цеха и помещены в бассейны УЗВ полигона водных биотехнологий биологического факультета, где содержались до марта 2010 г. В ходе выращивания молодь кормили гранулированными кормами 0.1 мм и 1.0 мм (Ecostart 17). Ежедневно измеряли температуру воды, один-два раза в неделю определяли содержание кислорода, рН, аммонийного азота, нитритов, нитратов, фосфатов, (рис. 1).

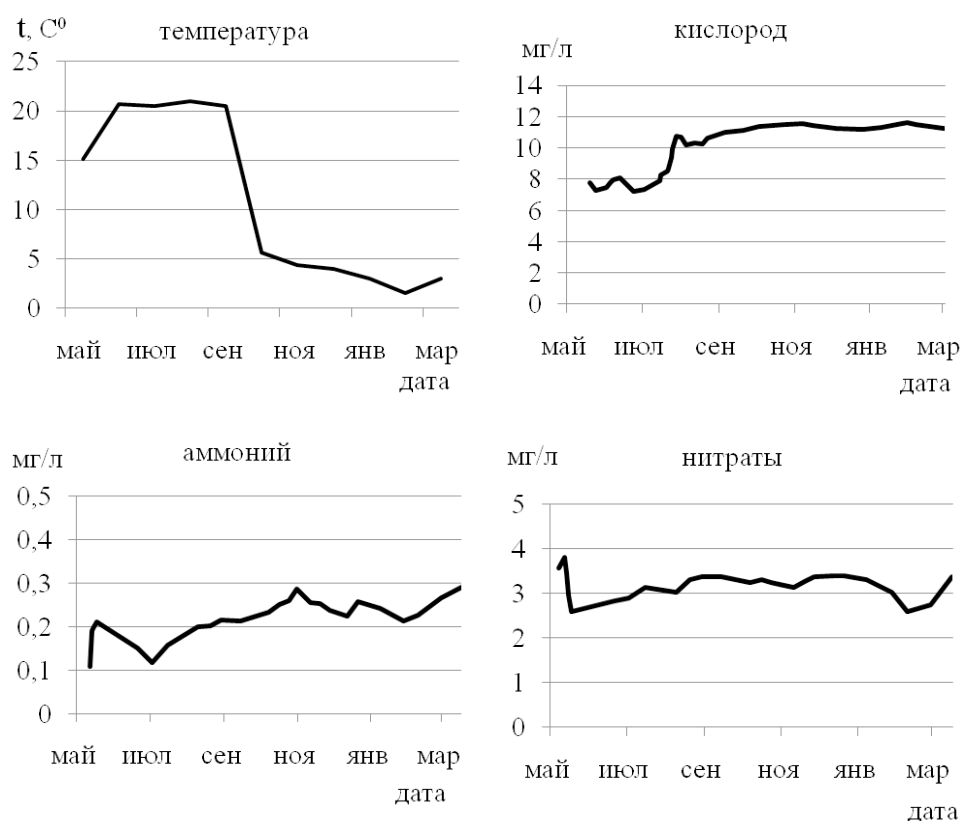


Рис. 1. Динамика некоторых показателей водного режима в УЗВ (2009-10 гг.)

Мальков и сеголеток муксуна — всего 86 экз. — измеряли (по Смитту) и взвешивали (до 0.01г), отпрепарированные гонады фиксировали в смеси Буэна с интервалами от 2 недель до 1.5-2 месяцев. У 52 экз. проводили гистологический анализ гонад [14]. Серийные парафиновые срезы (5мкм), полученные на микротоме HM 355S («Microm») и окрашенные железным гематоксилином по Гейденгайну, анализировали при увеличениях $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 1000$ на микроскопе «AxioImager A1» («Zeiss») с использованием видеокамеры AxioCam MRc5 и программного обеспечения AxioVision Release 4.7.1. У личинок отмечали локализацию, количество и размеры первичных гоноцитов, их морфологические особенности. У мальков и сеголеток измеряли гонады на фронтальных

* Использованное в работе оборудование приобретено на средства Инновационной образовательной программы Тюменского госуниверситета (2007-2008 гг.).

срезах, половые клетки и ядра; подсчет ППК и гониев производили на всей площади среза.

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронных таблиц пакета MS Excel.

Результаты. Анализируя динамику линейно-веса роста муксуна (рис. 2), можно видеть, что максимальные его значения пришлись на летний период, в течение зимовки несколько снизились, но рост не прекратился. Эти данные вполне согласуются с параметрами муксуна при его развитии в благоприятных условиях [15] и значительно превышают показатели, свойственные виду в естественном ареале [16], [17].

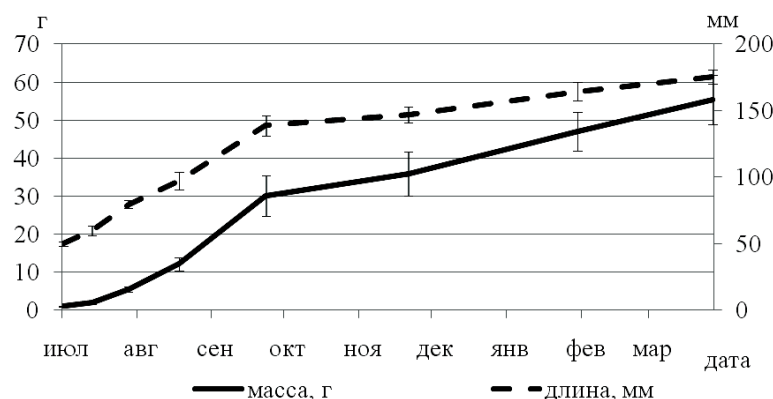


Рис. 2. Динамика линейно-веса роста муксуна (2009-10 гг.).

Индиферентный период развития гонад. В возрасте 31 суток половая система личинок муксуна находилась на прегонадной стадии развития [1]; все половые клетки были представлены ППК, и лишь у одной особи отмечали синцитиальные образования из 2-3 клеток [13]. Динамика цитоморфологических показателей и соотношение клеток разных генераций приведены (табл. 1, рис. 3). В крупных клетках ядро, как правило, занимало центральное положение (рис. 4а). Доля полиморфноядерных гоноцитов составила 4%, но их митозов не отмечали.

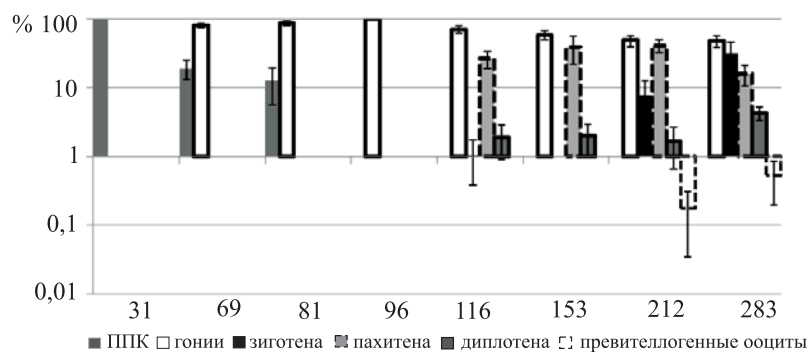


Рис. 3. Динамика половых клеток разных стадий развития у муксуна на первом году жизненного цикла (Y — логарифмическая шкала)

Период дифференцировки пола. К 69 суткам после вылупления гонады мальков муксуна уже были хорошо сформированы (табл. 1). У отдельных особей отмечены первые признаки сексуализации гонад. У этой молоди на латеральной поверхности проявлялись впячивания, а гонии локализовались под герминативным эпителием (рис. 4б), что позволяло предполагать начало анатомической дифференцировки по типу яичников. Пролиферирующие гониальные клетки имели небольшие размеры, редко встречались ППК. Митотический индекс (МИ) составлял 1,3%. У остальных мальков половые валики едва просматривались.

Спустя почти 2 недели у мальков 81-суточного возраста размеры гонад возросли (табл. 1). Процесс анатомической дифференцировки продолжался. У половины особей вблизи инвагинации (рис. 4в) располагались группы гониев. Увеличилось число гониальных митозов (рис. 4г; МИ — 2,1%), отчего размеры клеток снизились.

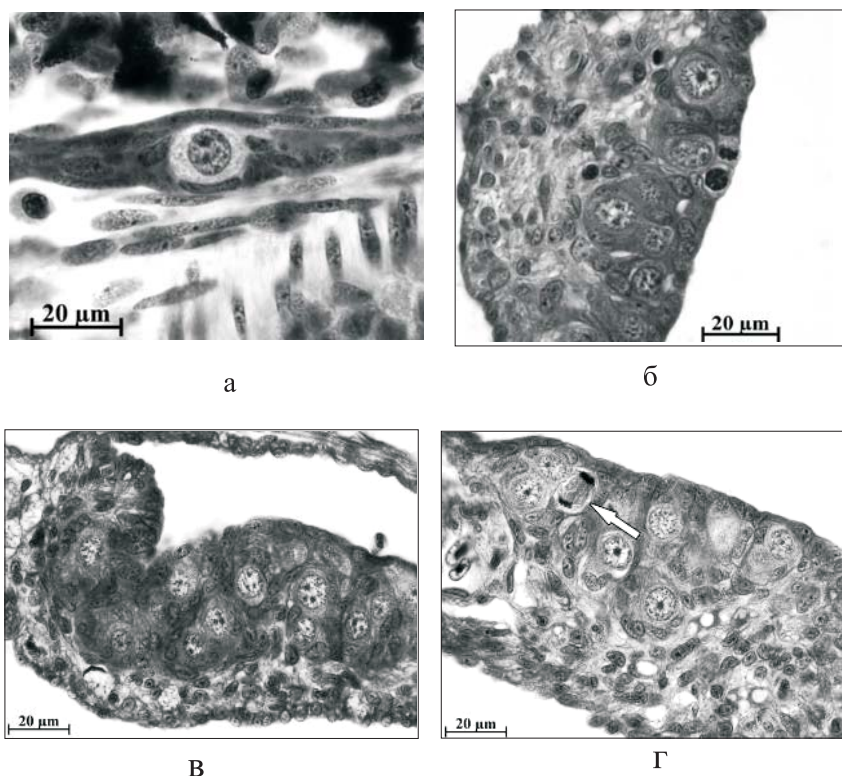


Рис. 4. Формирование гонад в раннем онтогенезе муксуна.

- а — первичный гоноцит в половом зачатке; возраст 31 сутки;
б — гонии I и следующих порядков у поверхности гонады; 69 суток;
в — начало анатомической дифференцировки гонады по типу яичников, гонии вблизи инвагинации герминативного эпителия; 81 сутки;
г — митоз гониальной клетки перед дифференцировкой гонады; там же.

В возрасте 96 суток рост гонад продолжался, все половые клетки представлены гониями (рис. 3). Вследствие увеличения размеров гонад и низкой митотической активности гониальные клетки все реже появлялись в плоскости среза, их размеры продолжали снижаться (табл. 1).

У 116-суточных сеголеток впервые были отмечены признаки цитологической дифференцировки гонад в направлении яичников, площадь которых к этому времени значительно возросла (табл. 2). В ооцитах проходили мейотические преобразования (рис. 3, рис. 5а). Среди оогоний отмечали незначительное количество полиморфноядерных клеток — 0,6%.

Таблица 1

Параметры формирующихся гонад и половых клеток у молоди муксуна в индифферентный период

Дата (возраст, сутки)	Число экз.	Размеры гонады (фронт.срез), мкм min-max	S гонады, мм ² $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Число клеток (на срезе гонады) $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Размеры ППК и гониев, мкм	
					Дклетки $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Дядра $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max
31.05.09 (31)	7	—	—	24,3±8,2* 5-70	16,6±0,3 10,5-22,8	9,9±0,1 6,9-12,8
8.07.09 (69)	5	52,1±3,9 — 126,0±17,6	0,005±0,001 0,004-0,008	2,3±0,8 0,5-4,8	10,9±0,2 8,2-13,1	7,9±0,1 6,0-10,2
20.07.09 (81)	6	66,6±4,6 — 170,2±23,9	0,009±0,001 0,004-0,015	1,8±0,4 3,2-0,8	10,0±0,1 7,1-13,2	7,3±0,1 4,7-9,9
4.08.09 (96)	10**	62,4±6,8 — 248,5±46,4	0,014±0,003 0,007-0,017	0,4±0,4 0-0,7	10,3±0,4 8,9-11,8	7,0±0,4 5,8-8,9

* — У мальков муксуна в 31 сут. приведено общее число ППК;

** — Учтены параметры гонад и гониев только у 3 особей (будущие самки).

Значительных изменений в структуре гонад у рыб в возрасте 153 суток не установлено, при том, что возросло количество ооцитов стадии пахитены (табл. 2, рис. 3, рис. 5б), а доля полиморфноядерных оогоний повысилась до 12,5%. У отдельных сеголеток на фронтальных срезах мелких гонад кровеносный сосуд находится в дорзальной части, а редкие гонимальные клетки характеризуются мозаичным распределением по всей площади среза, что позволяет считать началом анатомической дифференцировки половой железы по типу семенников.

У сеголеток в возрасте 212 суток дифференцировка яичников все еще продолжалась. Яйценозные пластинки оказывались сформированными лишь у отдельных особей (рис. 5в), и в них появлялись группы превителлогенных ооцитов (табл. 2, рис. 5г). Среди просмотренных особей отчетливо выделить будущих самцов оказалось невозможно, настолько у них слабо развиты половые железы.

Формирование фонда половых клеток. К 283-суточному возрасту в яичниках муксуна продолжал формироваться фонд половых клеток всех генераций (рис. 4). Размеры превителлогенных ооцитов возрастали, и в их цитоплазме наблюдали «зоны интенсивной окраски», являющиеся местом концентрации низкомолекулярных тРНК и рРНК. У самцов в формирующихся семенниках отмечались «аномальные» митозы (рис. 5д). Дифференцирующиеся по типу семенников гонады по-прежнему отличались небольшими размерами, а одиночные сперматогонии распределялись по всему объему гонады (рис. 5е).

Таким образом, формирование гонад, дифференцировка пола и становление фонда половых клеток на первом году в жизненном цикле муксуна даже в условиях оптимального режима содержания проходят в замедленном темпе, что позволяет считать позднее половое созревание отражением его видовой специфичности.

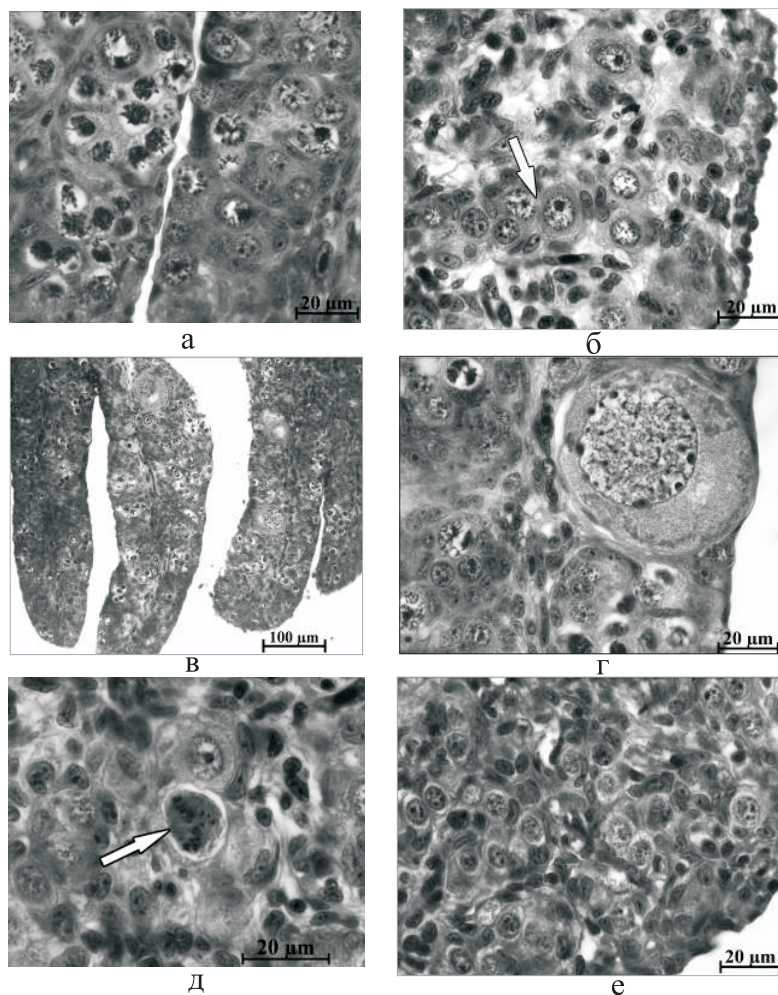


Рис. 5. Дифференцировка пола и формирование фонда половых клеток
а — цитологическая дифференцировка по типу яичников; ооциты стадий зиготены и пахитены; 115 суток;
б — в яичниках присутствуют ооциты стадии пахитены (стрелка); 153 суток;
в — участок яичника с яйценосными пластинками; 212 суток;
г — превителлогенные ооциты — старшая генерация половых клеток; там же;
д — в семеннике встречаются трехполюсные митозы гониев; 283 суток;
е — гонии распределяются по всему объему семенника; там же.

Таблица 2

Параметры гонад и половых клеток у сеголеток муксуна

Дата (возраст, сутки)	Число экз.	Размеры гонады (фронт.срез), мм min-max	S гонады, мм ² $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Диаметр женских половых клеток, мкм				
				Оогонии $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Зиготена $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Пахитена $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Ранняя диплота $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max	Превител- логенные $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ min-max
24.08.09 (116)	7	♀ 179,3±54,9— 388,9±73,4	0,059±0,022 0,009-0,18	9,9±0,3 8,9-11,7	10,8±0,2 8,0-13,5	12,8±0,4 10,0-16,2	17,6±0,3 12,9-24,4	—
30.09.09 (153)	4	♀ 120,2±4,8— 550,1±3,4	0,051±0,00 0,04-0,06	10,2±0,1 8,8-11,2	—	12,6±0,3 10,3-16,6	13,9±0,4 13,1-15,0	—
		♂ 36,6±1,3— 145,5±7,0	0,005±0,001 0,003-0,007					
28.11.09 (212)	6	♀ 297,6±69,8— 739,9±200,1	0,236±0,123 0,04-0,8	10,7±0,3 10,1-12,1	10,1±0,1 10,0-10,2	13,2±0,4 12,4-14,9	17,3±1,5 14,6-23,1	51,9±0,4 51,5-52,2
6.02.10 (283)	7	♀ 533,8±32,5— 966,1±81,5	0,407±0,046 0,3-0,5	10,7±0,4 9,9-11,6	9,6±0,6 7,9-10,7	14,5±0,7 12,6-16,2	28,1±1,2 25,3-30,9	66,7±0,7 66,0-67,4
		♂ 225,2±78,4— 492,9±48,3	0,09±0,033 0,02-0,1					

Обсуждение. Муксун является монотипичным длинноцикловым представителем сиговых рыб. В Оби самки муксуна ранее созревали в 6-7 лет [16], в реках Якутии — от 9+...11+ до 13+...14+ [16], [17], [18]. В условиях современного загрязнения Оби их половое созревание задерживается до 8+...11+ и более [12]. Установленная зависимость продолжительности оогонимального периода и периода протоплазматического роста от температурного режима, влияющих на сроки полового созревания [19], как это видно из полученных данных, требует уточнения. Нами показано, что при благоприятных температурных, кислородных и кормовых условиях содержания у особей обоих полов гонимальная пролиферация понижена, а дифференцировка пола и начало формирования превителлогенных ооцитов растягивается на несколько месяцев. В сравнении с аналогичными процессами у молоди пеляди [7] и тугуна [10], у муксуна при сходных размерно-весовых параметрах уровень развития гонад неизмеримо ниже. Темп гонадогенеза совпадает с таковым у байкальского омуля [9], однако температуры воды при содержании омуля в летний период были намного ниже (10.7-17.1°C), чем при выращивании муксуна, что также подтверждает слабое развитие его репродуктивной системы.

Низкий темп гонадогенеза и, соответственно, медленное половое созревание муксуна, очевидно, предполагает столь же длительный период накопления фонда половых клеток до перехода к половой зрелости. Эта тенденция сохраняется в дальнейшем, когда посленерестовая репарация репродуктивной системы у самок продолжается в течение двух- и трехлетнего цикла [11], [12]. Только в благоприятных условиях за пределами естественного ареала [20] продолжительность полового цикла не превышает двух лет.

Проведенные исследования с использованием анализа мтДНК и изоферментных локусов муксуна показали [21], что этот вид характеризуется гибридным происхождением. Как предполагает автор, в истории его становления принимали участие некий пыжьяновидный сиг и виды комплекса ряпушек и пеляди. Именно с позиций гибридного происхождения муксуна может быть объяснимо столь медленное развитие его репродуктивной системы. Известно, что лососевидные рыбы, тетраплоидные по происхождению [22], включают сиговых и отличаются высоким темпом гаметогенеза [3]; среди монотипичных сиговых таковым является тугун [10]. Гбридам же свойственны стерильность, слабое развитие репродуктивной системы, задержка на одном из этапов гаметогенеза и интерсексуальность. В исследованиях на гибридной форме чира с пелядью (пелчир) было показано [8], что у нее наблюдается задержка гаметогенеза на ранней профазе мейоза, блокировка перехода к превителлогенезу, появление и нарастание доли интерсексуальных особей в старших возрастных группах — как следствие изменения генома. Т.е. гибридное происхождение отчетливо проявляется в характере функционирования репродуктивной системы, оказывая супрессивное влияние на сроки полового созревания и темп восстановления гонад в меженерестовый период.

Еще одним возможным подтверждением гибридогенеза муксуна может служить достаточно высокая частота — 20-30% в 6+...9+ — интерсексуальных особей на салмах (мелководьях) Обской губы [11].

Располагая приведенными данными, зададимся вопросом: не является ли замедленное развитие гонад платой несбалансированного генотипа за исторически закрепленную комплексной межвидовой гибридизацией миссию вида «муксун», а не результатом аномалий в раннем онтогенезе по причине спонтанной гибридизации и/или высоких техногенных нагрузок на водные экосистемы, как предполагалось нами ранее [11]?

Выводы

В течение месяца после вылупления у мальков муксуна в условиях оптимального режима содержания половые клетки в герминативных валиках были представлены исключительно первичными гоноцитами.

Анатомическая дифференцировка гонад по типу яичников у разных особей продолжается от 2 до 5 и более месяцев, цитологическая дифференцировка начинается с 4-месячного возраста; у отдельных сеголеток признаки дифференцировки гонад в семенники впервые обозначаются в возрасте 5 месяцев.

Первые превителлогенные ооциты появлялись в яичниках отдельных самок в семь месяцев; у большинства особей гонады находились в процессе дифференцировки или в индифферентном состоянии; формирование фонда половых клеток у муксуна проходит в замедленном ритме.

Установленный низкий темп гонадо- и гаметогенеза в постэмбриональном периоде муксуна даже в оптимальных температурных, кислородных и кормовых условиях содержания свидетельствует о видовой специфичности, что может быть следствием его природной гибридизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Персов Г.М. Надежность функционирования репродуктивной системы рыб // Вопр. ихтиологии. 1972. Т. 12. Вып. 2(73). С. 258-272.
2. Персов Г.М. Ранний период гаметогенеза у проходных лососей // Тр. ММБИ. 1966. Вып. 12(16). С. 7-44.
3. Персов Г.М. Дифференцировка пола у рыб. Л.: ЛГУ, 1975. 148с.
4. Чмилевский Д.А. Оогенез рыб в норме и при экстремальных воздействиях. Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 31 с.
5. Kobayashi, T. In vitro germ cell differentiation during sex differentiation in a teleost fish // Intern. Journ. Dev. Biol. 2010. V. 54. P.105-111.
6. Статова М.П., Томнатик Е.Н. Процесс анатомической и цитологической дифференцировки пола у пеляди // Изв. АН Молд.ССР. Сер. биологич. и химич. наук. 1970. №1. С. 36-39.
7. Селюков А.Г. Ранний гаметогенез пеляди *Coregonus peled* (Gmelin) // Вестник Ленингр. университета. 1985. № 17. Биология. С. 26-32.
8. Богданова В.А. Нарушения оогенеза у гиногенетических и гибридных форм сиговых рыб // Труды БиНИИ СПбГУ. 1997. Вып. 44. С. 91-99.
9. Захарова Н.И. Дифференцировка пола у байкальского омуля при различных температурных режимах выращивания // Труды БиНИИ СПбГУ. 1997. Вып. 44. С. 65-73.
10. Селюков А.Г., Шуман Л.А., Ефремова Е.В. Применение установок замкнутого водоснабжения для формирования маточных стад сиговых рыб (на примере тугуна) // Вестник ТюмГУ. 2010. № 7. С. 122-129.
11. Селюков А.Г. Морфофункциональный статус рыб Обь-Иртышского бассейна в современных условиях. Тюмень: Изд-во ТюмГУ, 2007. 184 с.

12. Исаков П.В., Селюков А.Г. Сиговые рыбы в экосистеме Обской губы. Монография. Тюмень:ТюмГУ, 2010. 184 с.
13. Селюков А.Г., Ефремова Е.В., Бондаренко Г.Н. Цитоморфологические преобразования первичных половых клеток в эмбриогенезе муксуна *Coregonus tuksun* (Pallas) // Вестник ТюмГУ. 2010. № 3. Медико-биологические науки. Науки о Земле. Химия. С. 45-51.
14. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1953. 718 с.
15. Гундризер А.Н., Зимин А.Г., Попков В.К., Рузанова А.И. Натурализация муксуна в высокогорном озере Республики Алтай // М-лы VI Всеросс. совещ. по биологии и биотехнике развед. сиговых рыб. Тюмень. 2001. С. 43-46.
16. Москаленко Б.К. Биологические основы эксплуатации и воспроизводства сиговых рыб Обского бассейна // Тр. Обь-Тазовск. отд. ВНИОРХ. Нов. серия. 1958. Т. I. 251 с.
17. Кириллов Ф.Н. Рыбы Якутии. М: Наука. 1972. 359 с.
18. Дормидонтов А.С. Особенности гаметогенеза сигов в северных водоемах Якутии // Зоол.исслед. Сибири и Дальнего Востока. Владивосток. 1974. С. 169-173.
19. Кузьмин А.Н. Некоторые закономерности развития воспроизводительной системы и периодизация гаметогенеза у сиговых (ихтиофауны СССР, включая Сибирь) // Изв. ГосНИОРХ. 1975. Т. 104. С. 17-27.
20. Кузьмин А.Н., Крупкин В.З. Развитие воспроизводительной системы у самок муксуна при выращивании их в водоемах северо-запада СССР // Вопр. ихтиологии. 1976. Т. 16. Вып. 6. С. 1033-1042.
21. Балдина С.Н. Внутривидовая генетическая дифференциация и филогеография сигов (р. *Coregonus*) Сибири: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М: Ин-т общей генетики РАН. 2010. 23 с.
22. Осин А.Г., Лебедев В.С. Лососевые рыбы (Salmonidae, Salmoniformes): положение в надотряде Protacanthopterygii, основные этапы эволюционной истории, молекулярные датировки // Вопр. ихтиологии. 2004. Т. 44. № 6. С. 738-765.