



На правах рукописи
УДК 597.552.5:591.3:57.044

ЕФРЕМОВА
Екатерина Владимировна

**РАННИЙ ГАМЕТОГЕНЕЗ СИГОВЫХ РЫБ р. *COREGONUS*
В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ**

Специальность: 03.02.06 – иктиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

21 МАР 2013

МОСКВА – 2013

Работа выполнена в Центре экологических исследований и реконструкции биосистем биологического отделения Института математики, естественных наук и информационных технологий ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет».

Научный руководитель: Селюков Александр Германович
доктор биологических наук, доцент
Тюменский государственный университет

Официальные оппоненты: Бурлаков Александр Борисович
доктор биологических наук, профессор
Биологический факультет Московского
государственного университета (МГУ) имени
М.В.Ломоносова, ведущий научный
сотрудник

Павлов Ефим Дмитриевич
кандидат биологических наук
Институт проблем экологии и эволюции
(ИПЭЭ) РАН, научный сотрудник

Ведущая организация: Государственный научно-исследовательский
институт озерного и речного рыбного
хозяйства (ГосНИОРХ)


Защита состоится 12 апреля 2013 г. в 11⁰⁰ ч. на заседании
диссертационного совета Д 307.004.01 при Всероссийском научно-
исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП
«ВНИРО») по адресу: 107140 г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17.

Факс 8-499-264-91-76, электронный адрес: sedova@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского
научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии.

Автореферат разослан «06» 03 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Седова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сиговые рыбы (Coregonidae, Salmoniformes) являются важными представителями ихтиофауны озерно-речных систем субарктической и бореальной природно-климатических зон Евразии и Северной Америки. Об их филогении, месте возникновения и путях расселения высказываются спорные и нередко противоположные мнения [Пирожников и др., 1975; Решетников, 1975, 1980, 2010; Шапошникова, 1976; Бодали и др., 1994; Сендек, 2000; Боровикова, Махров, 2009; Политов и др., 2010 и др.]. Вследствие высокой морфо-экологической пластичности, сложной внутривидовой структуры и повышенной межвидовой гибридизации таксономический статус этих рыб по-прежнему остается неясным.

Будучи ценными объектами рыболовства, природные популяции сиговых рыб подвергаются значительному перелову, нарушающему равновесие внутри- и межпопуляционного генного разнообразия. Неверно выбранные подходы при разведении снижают рост, плодовитость, устойчивость рыб к болезням и стрессам; снижение уровня гетерозиготности ведет к низкому темпу эмбриогенеза [Андрияшева, 2011 и др.], а загрязнение окружающей среды подавляет развитие. В эмбриональный и постэмбриональный периоды формируется линия половых клеток, закладываются основы репродукционного потенциала, регулируется дифференцировка пола, происходит становление потенциальной плодовитости [Персов, 1966, 1975; Чмилевский, 1971, 2000; Рязанцева, Сакун, 1980; Lebrun et al., 1982; Селюков, 1985; Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, 2002; Зеленников, 2003; Arezo et al., 2007; Gao et al., 2009 и др.].

В Обь-Иртышском бассейне основные нерестилища сиговых рыб расположены в пока еще чистых уральских притоках Нижней Оби; однако уже в ближайшие годы техногенное давление на них может многократно возрасти вследствие реализации мегапроекта «Урал промышленный – Урал Полярный» [http://www.strategy-center.ru/stock/pics/-Ur_prom-Ur_polar]. В их воды будут поступать взвеси дражных разработок, каменного угля, тяжелые металлы и другие загрязнители, в т.ч. нефтепродукты и высокотоксичный фенол, что

приведет к уничтожению нерестилищ этих видов. Известно, что наиболее уязвимыми у рыб оказываются ранние стадии развития [Данильченко, Строганов, 1975; Данильченко, 1977; Моисеева, 1997; Чмилевский, 1997; Таликина и др., 1999; Nguyen et al., 1999; Руднева, Залевская, 2004; Bourrachot et al., 2008; Foekema et al., 2008], когда еще не сформировались механизмы токсикорезистентности. Среди представителей высшего трофического уровня пресноводных экосистем Обь-Иртышского бассейна сиговые рыбы являются наименее устойчивыми к интоксикации. Вследствие чего возникла настоятельная необходимость в установлении возможных рисков и последствий токсикологической нагрузки на ранние стадии развития и формирующуюся репродуктивную систему этих видов и перспективы их существования в условиях постоянной или кратковременной интоксикации.

Целью работы является цитоморфологическая оценка гаметогенеза сиговых рыб рода *Coregonus* в эмбриональный и постэмбриональный периоды в различных условиях содержания для определения возможных рисков при их развитии в естественных водоемах и в процессе формирования маточных стад при искусственном разведении.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Исследовать и проанализировать межвидовые различия сиговых рыб в эмбриональный период по морфологическим показателям первичных половых клеток (ППК), выявить взаимосвязь и значимость отдельных цитометрических параметров.

2. Установить особенности развития, цитоморфологию ППК и смертность зародышей сига *Coregonus lavaretus maraenoides* и его гибрида с рипусом *Coregonus albula* infrsp. *ladogensis* под воздействием разных концентраций экотоксиканта фенола.

3. Исследовать особенности дифференцировки пола у муксуна *C. muksun* как длинноциклового вида в регулируемых условиях водной среды.

4. Изучить динамику формирования фонда половых клеток в яичниках сеголеток сиговых рыб с разной продолжительностью жизненного цикла –

тугуна *C. tугун*, муксуна и сига – в условиях установки замкнутого водообеспечения (УЗВ).

Научная новизна. Впервые изучены особенности распределения и соотношение разных состояний первичных половых клеток в эмбриональном периоде у сиговых рыб и с использованием методов многомерной статистики установлено, что среди исследованных цитоморфологических параметров ППК ведущим показателем при оценке межвидовых различий является количество ядрышек. Показано, что в экстремальных условиях содержания, при фенольной интоксикации, наиболее чувствительным показателем при характеристике первичных гоноцитов сиговых рыб в эмбриональный период является состояние ядрышкового аппарата. У муксуна и сига, в отличие от тугуна, в контролируемых условиях УЗВ выявлены низкие темпы дифференцировки гонад и развития репродуктивной системы. Впервые установлены особенности формирования фонда половых клеток у тугуна, муксуна и сига в УЗВ, используемые в качестве модели при создании маточных стад сиговых рыб индустриального типа.

Практическая значимость. Представленные в работе результаты производственных экспериментов с эмбрионами и молодью сиговых рыб в зарегулированных условиях водной среды, направленные на изучение раннего гаметогенеза, характера и динамики пополнения ППК как основы формирования потенциальной плодовитости, могут послужить важным звеном в аналогичных исследованиях других объектов холодноводного рыбоводства в УЗВ. Полученные данные о сроках дифференцировки пола и состоянии фонда половых клеток у сиговых рыб с разной продолжительностью жизненного цикла можно использовать в рыбоводной практике при формировании маточных стад этих ценных видов. Оценка характера и степени влияния фенола – энзиматического яда с нейротоксическими свойствами – на зародышей сиговых рыб и состояние их первичных гоноцитов необходимы при разработке нормативов в водной токсикологии.

Результаты исследований используются при чтении лекций и проведении практических занятий по спецкурсам бакалавриата «Общая ихтиология» и «Экология рыб», магистратуры «Систематика и филогения рыб», «Антропогенное воздействие на биологические системы» отделения биологии Тюменского государственного университета.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Пресноводная аквакультура: состояние, тенденции и перспективы развития» (Тюмень, 2008); X Международном симпозиуме по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб (Виннипег, Канада, 2008); VI Международном форуме по проблемам науки, техники и образования (Москва, 2008); на конференции молодых ученых «Биосфера Земли: прошлое, настоящее, будущее» (Екатеринбург, 2008); II Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Полевые и экспериментальные исследования биологических систем» (Ишим, 2009); I конференции молодых ученых NACEE «Вопросы аквакультуры» (Тюмень, 2009); 7 Международном научно-производственном совещании по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб (Тюмень, 2010); симпозиуме «Мегагранты окружающей среде России» (Санкт-Петербург, 2012); I Всероссийской конференции «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), на научно-методологических семинарах кафедры зоологии и эволюционной экологии животных Тюменского университета (2009-2012) и лаборатории качества вод, устойчивости водных экосистем и экотоксикологии Тюменского университета (2011-2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Положения, выносимые на защиту:

1. При характеристике сиговых рыб по морфологическим показателям ППК в эмбриональный период наиболее значимым параметром является число ядрышек; изменения в структуре ядрышек отражают степень интоксикации.

2. Молодь разных видов сиговых рыб с повышенной интенсивностью соматического роста в контролируемых условиях содержания обладает разным уровнем развития репродуктивной системы, что необходимо учитывать при формировании маточных стад индустриального типа.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав результатов, обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Объем диссертации составляет 150 стр. машинописного текста и 28 стр. приложений, 15 таблиц, 65 рисунков (в том числе 50 микрофотографий). Список цитированной литературы включает 295 источников, в том числе 85 на английском языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю Александру Германовичу Селюкову за ценные советы, понимание и всестороннюю помощь на всех этапах подготовки диссертации. Сердечно благодарит бывшего доцента кафедры зоологии и эволюционной экологии животных к.б.н. Г.Н.Бондаренко, в настоящее время научного сотрудника лаборатории популяционной генетики Института общей генетики имени Н.И.Вавилова РАН, а также аспиранта кафедры Л.А.Шумана – за помощь в сборе и обработке материала. За предоставленный материал автор весьма признателен зав. отделом воспроизводства рыбных запасов Госрыбцентра к.б.н. С.М.Семенченко и зав. сектором лососеводства Н.В.Смешливой.

Глава 1. Обзор литературы

Приводится обзор литературы о формировании линии половых клеток в раннем онтогенезе животных. Рассматриваются спорные вопросы происхождения, морфологии и пролиферации первичных половых клеток, их миграции к зачатку гонад и локализации [Персов, 1966, 1975; Вивьен 1968; Eddy, 1975; Рязанцева, Сакун, 1980; Айзенштадт, 1984; Захарова, 1984; Селюков, 1985; Timmermans, Taverne, 1989; Божкова и др., 1993; Yoon et al., 1997; Чмилевский, Иосифова, 1999; Braat et al., 1999; Raz, 2000; Исаева, Реунов,

2001; Otani et al., 2002; Реунов и др., 2004; Александрова, 2005; Берекеля и др., 2005; Fujimoto et al., 2006; Kurokawa et al., 2006; Theusch et al., 2006; Extavour, 2007; Herpin et al., 2007; Исаева и др., 2009; Tran et al., 2012 и др.].

Проанализированы литературные данные о влиянии различных токсикантов на ранние стадии развития рыб и формирование репродуктивной системы [Петухов, Сторожук, 1980; Костров, Шеханова, 1981; Таликина 1999, 2000, 2001а; Руднева и др., 2000; Руднева, Залевская, 2004 и др.]. Отмечается, что рыбы в раннем онтогенезе, вследствие неполной сформированности защитных и детоксикационных механизмов, в наибольшей степени чувствительны к воздействию ксенобиотиков [Данильченко, 1977; Nguyen et al., 1999; Bourrachot et al., 2008; Foekema et al., 2008; McIntosch et al., 2010], однако патологические изменения часто проявляются у личинок, ко времени их перехода к мальковому этапу и у сеголеток [Данильченко, Строганов, 1975; Таликина 1999, 2000, 2001а]. При этом их реакции на интоксикацию видоспецифичны, а степень поражения зависит от природы токсиканта, продолжительности экспозиции и стадии онтогенеза. Отмечен пролонгированный характер интоксикации, в наибольшей степени проявляющийся в различных цитогенетических нарушениях, интерсексуальности, дегенерации гонад.

Приводятся литературные сведения об особенностях гамето- и гонадогенеза в постэмбриональный период у рыб; о дифференцировке пола, ее регуляции [Федоров и др., 1990; Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, Федоров, 2001] и формировании фонда половых клеток у разных систематических групп [Персов, 1962, 1975; Takashima et al., 1980; Lebrun et al., 1982; Захарова, 1984; 1997; Селюков, 1985, 1987; Strüssmann et al., 2002; Бондаренко, 2003; Koya et al., 2003; Meijide et al., 2005; Arezo et al., 2007; Vizziano et al., 2007; Grandi et al., 2008; Tanaka et al., 2008; Gao et al., 2009]. Показано, что темп гаметогенеза во многом обусловлен температурным и кормовым режимами при разведении рыб в условиях естественного ареала и при интродукции [Кузьмин, 1967; Кузьмин, Крупкин, 1976; Акимова, 1985; Селюков, 1989; Павлов, 2011 и др.], замедление

темпа гаметогенеза или его ускорение приходится на гониальный период, период дифференцировки пола, превителлогенез и фазу вакуолизации у самок, сперматогониальный период – у самцов [Казанский, 1956; Персов, 1966, 1972, 1975; Кузнецов, 1975; Кондратьев, 1977; Селюков, 1987, 2010; Акимова, 1988, 1992; Чмилевский, 2000; Зеленников, 2003 и др.; Беляев и др. 2004].

Глава 2. Материал и методики

Исследования эмбрионов, личинок, мальков и сеголеток муксуна, чира *C. nasus*, сига-пыжьяна *C. lavaretus pidschian*, тугуна и пеляди *C. peled* проводили в Центре экологических исследований и реконструкции биосистем и на базе полигона водных биотехнологий (УЗВ) биологического факультета Тюменского университета в 2005-2011гг. Морфологические особенности первичных гоноцитов изучали у зародышей во второй половине эмбрионального периода, с начала пигментации глаз до вылупления. У предличинок, личинок и мальков этих видов анализировали половые клетки до их перехода к митозам, т.е. до 30-40 суток.

С января по март 2011г. был поставлен эксперимент по влиянию фенола на эмбриогенез сига и его гибрида с рипусом. Через 30 суток после оплодотворения, в начале органогенеза, зародыши сига и гибрида (по 30 экз. в 3 повторностях на каждый вариант и контрольную партию) были помещены в водные растворы фенола (0.01 мг/л – 1 вариант и 0.02 мг/л – 2 вариант), сменяемые каждые трое суток. После 30-суточной экспозиции подопытные зародыши вновь были переведены в чистую воду. Эксперимент был завершен на 154 сутки.

Исследовали динамику размерно-весовых показателей, дифференцировку пола и начальные этапы формирования фонда половых клеток у сеголеток тугуна, муксуна и сига, выращиваемых в бассейнах УЗВ в 2008-2011гг. Проводили измерения (по Смитту, мм) и взвешивание молоди (до 0.01г). Измеряли температуру и содержание кислорода в воде, при помощи

ионспецифичного измерителя С205 («Hanna») определяли рН, аммонийный азот, железо, нитриты и нитраты.

Зародышей и личинок сиговых рыб, гонады сеголеток и годовиков фиксировали в смеси Буэна, по 8-10 экз. на каждую дату. Зафиксированный материал обезвоживали в спиртах (начиная с 40%), через бутанол и хлороформ-парафин заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме «МЗП-01 ТЕХНОМ» в режиме замораживания (-18°C), а позднее на автоматизированном ротационном микротоме с системой переноса срезов НМ 355S («Microm»). Окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну. Препараты анализировали на микроскопе AxioImager A1 («Zeiss») и фотографировали с помощью видеокамеры AxioCam MRc5 («Zeiss»), используя лицензионное программное обеспечение AxioVision 4.7.1.

У эмбрионов и личинок учитывали локализацию, количество и размеры первичных гоноцитов, их морфологические особенности. У мальков и сеголеток на фронтальных срезах измеряли гонады, диаметр половых клеток и ядер. Подсчет ППК и гониев производили на всей площади среза. В ячниках подсчитывали соотношение половых клеток разных генераций. Определяли соотношение (%) ооцитов ранней профазы мейоза (зиготена, пахитена, ранняя диплотена), а при появлении превителлогенных ооцитов их подсчитывали на каждом пятом срезе.

Для статистического анализа использовали ППП STATISTICA (v.6) и Ms Excel 2003, 2007; вычисляли основные статпоказатели, проводили полный дискриминантный и кластерный анализы. В кластерном анализе применяли двухсвязный парногрупповой метод в метрике «1-г Пирсона».

Общий объем материала соответственно для общебиологического и гистологического анализа составил 157 и 198 экз. муксуна, 94 и 103 экз. чира, 77 и 91 экз. сига-пыжьяна, 159 и 85 экз. тугуна, 105 и 88 экз. пеляди, 154 и 52 экз. сига, 90 и 31 экз. гибрида сиг \times рипус. Проанализировано 33065 первичных гоноцитов и других половых клеток на разных стадиях гаметогенеза.

Глава 3. Морфодинамические характеристики первичных половых клеток в эмбриогенезе сиговых рыб

Сиговые рыбы рода *Coregonus* подразделяются на подроды сигов с нижним ртом (*Coregonus sensu stricto*) и сигов с верхним и конечным ртом (*Leucichthys*) [Решетников, 1980]. Сиги-бентофаги в водоемах Западной Сибири представлены сигом-пыжьяном и чиром. *Сиги-планктофаги* – ряпушкой, тугуном, пелядью и омулем; планктобентофаг муксун – многотычинковый сиг с нижним ртом.

3.1. Цитоморфологические изменения ППК у зародышей сиговых рыб.

В разные годы у *муксуна* во вторую половину эмбриогенеза, начиная с пигментации глаз до вылупления, цитоплазма первичных гоноцитов имеет низкую оптическую плотность, а количество ядрышек не превышает 2-3. В процессе миграции в зачатки гонад ППК претерпевают морфологические изменения, которые проявляются в полиморфноядерности и сгруппированности в синцитиальные образования (рис. 1а); встречающиеся при этом митозы очень редки. В течение периода с начала пигментации глаз до пигментации кожных покровов число ППК у зародышей оказывается существенно ниже, чем в более поздние сроки, что может быть обусловлено продолжающимся заселением гонад первичными гоноцитами.

Сходные явления отмечаются в эмбриогенезе *чир*. Так, число ППК изменяется от 1 до 86, тогда как их среднее значение варьирует слабо; количество ядрышек в первичных гоноцитах составляет 1-5, изредка достигая 6. К концу эмбрионального периода число полиморфноядерных ППК и их доля в составе синцитиев снижаются, тогда как количество одиночных клеток возрастает.

В эмбриогенезе *сига-пыжьяна*, начиная со стадии пигментации глаз, отмечена низкая численность ППК; они имеют овальную форму с неровными краями. В ядре отмечено от 1 до 4 ядрышек, хроматин распределяется по всему объему ядра. Встречаются двухядерные и множество полиморфноядерных ППК и гоноцитов в составе синцитиев. На разных стадиях

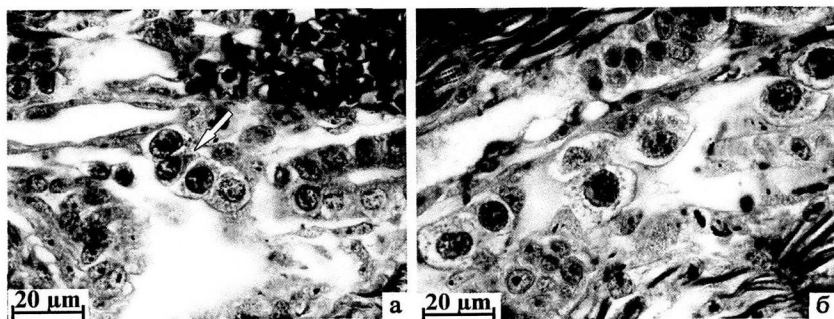


Рис. 1. Первичные половые клетки у эмбрионов сиговых рыб.
 а – ППК муксуна в составе синцитиального комплекса; 95 суток;
 б – ППК тугуна; 141 сутки.

эмбриогенеза соотношение таких клеток и в них ядрышек постоянно варьирует, а при завершении эмбрионального периода снижаются полиморфноядерность и митотическая активность.

У зародышей *пеляди* с начала пигментации глаз количество ППК флуктуирует, но остается на одном уровне до вылупления; число полиморфноядерных ППК достигает трети от общего числа гоноцитов, в ядре 1-3 ядрышка. К концу эмбриогенеза возрастает доля синцитиев, которые находятся в обратном соотношении с числом митозов. При сравнительно невысоком числе ППК их цитоморфологические характеристики у пеляди отличаются от этих показателей у зародышей других видов сиговых рыб слабо выраженными изменениями в динамике количества, полиморфноядерности и числе клеток в составе синцитиев.

У *тугуна* во вторую половину эмбрионального периода динамика количества и цитоморфологических показателей ППК значительно варьирует; отмечается различное соотношение полиморфноядерных клеток и число ППК в составе синцитиальных образований (рис. 1б). Доля полиморфноядерных ППК и клеток в составе синцитиев характеризуются обратной зависимостью. Количество и размеры одиночных ППК возрастают к концу эмбриогенеза, 1-2 крупных ядрышка располагаются в центре ядра. На этапе вылупления доля ППК в синцитиальных комплексах повышается.

Таким образом, у эмбрионов разных видов сиговых рыб с начала пигментации глаз до вылупления формирование линии половых клеток существенно различается. Эти различия проявляются в количественной динамике ППК, их морфологических характеристиках, межклеточных взаимосвязях и пролиферативной активности. У муксуна и тугуна количество первичных гоноцитов, полиморфноядерных, многоядерных ППК и клеток в составе герминативных синцитиев намного превышает эти показатели у чира, сига-пыжьяна и пеляди.

3.2. Оценка межвидовых отношений сиговых рыб по цитометрическим показателям ППК в эмбриональный период. Для установления межвидовых отношений пяти представителей типичных для Обь-Иртышского бассейна сиговых рыб на основе цитометрических параметров первичных гоноцитов у эмбрионов в начальный период формирования репродуктивной системы – миграции ППК к зачаткам гонад – и выявления ведущего показателя были использованы дискриминантный и кластерный анализы [Боровиков, 2003].

Дискриминантный анализ показал, что ведущим признаком в разделении видов в эмбриональный период является количество ядрышек в первичных гоноцитах (Nnl). Второе по значению вкладу место принадлежит диаметру ядра (Dn), третье – числу одиночно лежащих ППК (Nc), следующие по значимости в разделении видов занимают количество ППК в синцитиях (Ncs) и диаметр первичных гоноцитов (Dc). В соответствии с линейным коэффициентом детерминации, между видами в этот период отмечена слабая связь: от 0.078210 (Nnl) до 0.402337 (Nc). Все исследуемые переменные характеризуются низкой избыточностью, притом наименьшей – число ядрышек, что свидетельствует о независимости данного показателя от всех остальных. Можно видеть (рис. 2), что по первой дискриминантной функции (координата 1) исследуемые виды подразделяются на 3 группы: первая представлена муксуном, который обособлен от других видов, во вторую входят сиг-пыжьян, пелядь и тугун, в третьей находится чир. По второй функции (координата 2) дискриминация

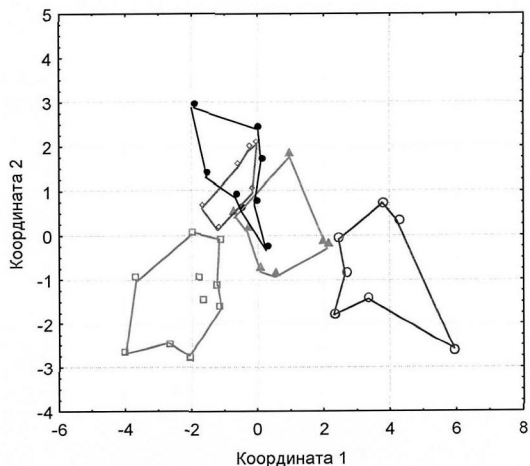


Рис. 2. Положение группировок эмбрионов сиговых рыб по 5 параметрам ППК в координатах полного дискриминантного анализа
 ◦ *Coregonus muksun* ◻ *Coregonus nasus* ▲ *Coregonus lavaretus pidschian*
 ◊ *Coregonus peled* • *Coregonus tugun*

между группами выражена слабее. Сиг-пыжьян, как по первой, так и по второй координатам занимает промежуточное положение, а такие виды как тугун и пелядь слабо различаются по обеим дискриминантным функциям. С использованием квадрата дистанции Махаланобиса виды ранжируются по расстоянию между ними: пелядь→тугун→сиг-пыжьян→чир→муксун (табл. 1).

Таблица 1. Оценка расстояний между классами в дискриминантном анализе

Классы	<i>C. peled</i>	<i>C. muksun</i>	<i>C. l. pidschian</i>	<i>C. tugun</i>	<i>C. nasus</i>
<i>C. peled</i>		13.1	5.3	4.3	7.9
<i>C. muksun</i>	27.4		6.4	14.8	23.8
<i>C. l. pidschian</i>	11.0	12.2		2.3	8.2
<i>C. tugun</i>	8.4	26.0	4.1		8.9
<i>C. nasus</i>	14.0	37.6	12.9	12.8	

Примечание. Над диагональю значения F-критерия при различении классов, под диагональю – квадрат дистанции Махаланобиса.

При вычленении из суммы признаков числа ППК в составе синцитиальных комплексов, по которым виды существенно разделяются,

диспозиция видов на диаграмме практически не изменяется, что свидетельствует о низкой значимости данного показателя. Наибольший вес и в этом варианте имеет число ядрышек (Nnl). Для выяснения степени значимости данного признака для разделения видов, он был удален из суммы остальных, после чего наиболее весомым показателем стал диаметр ядра ППК. В результате муксун оказался еще более обособленным от остальных сиговых, тогда как бентофаг-чир «объединился» с планктофагом-тугуном, поменявшись местами с планктофагом-пелядью (рис. 3).

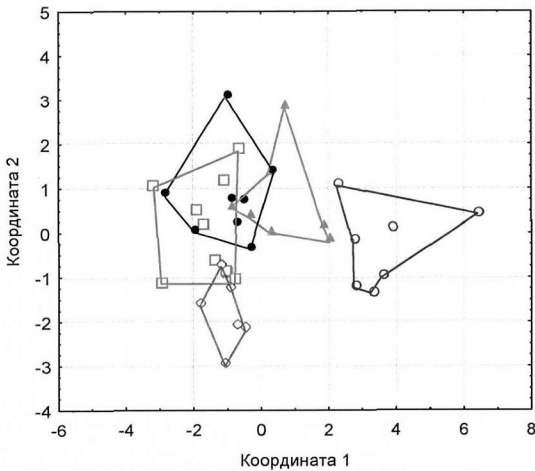


Рис. 3. Положение группировок эмбрионов сиговых рыб в координатах полного дискриминантного анализа (без учета ядрышек).

Дискриминантный анализ, проведенный на этапе вылупления, продемонстрировал отчетливое отделение тугуна от остальных видов (рис. 4). После выведения тугуна оставшиеся виды перераспределились: чир остается в центре и по первой (координата 1), и по второй (координата 2) дискриминантным функциям, пелядь смещается к периферии, а сиг-пыжьян отличается широким разбросом вариантов. Диспозиция повернулась как бы

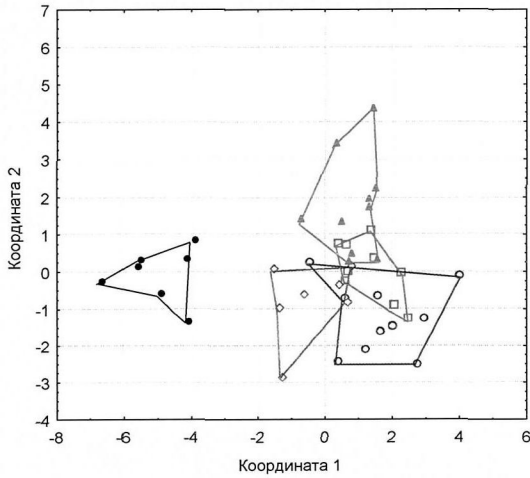


Рис. 4. Положение группировок предличинки сиговых рыб на этапе вылупления в координатах полного дискриминантного анализа

○ *Coregonus muksun* □ *Coregonus nasus* ▲ *Coregonus lavaretus pidschian*

◇ *Coregonus peled* • *Coregonus tugun*

против часовой стрелки на 90° (рис. 5). При этом наибольший вклад в разделение видов вносит диаметр ядра, за которым следует диаметр клетки, тогда как число ядрышек занимает лишь третье место. Однако в разные годы на данной стадии онтогенеза лидировать в разделении видов по цитометрическим параметрам может или диаметр ядра, или количество ядрышек. Исключение из состава показателей числа ядрышек в ППК привело к полному смешению видов (рис. 6), что подтверждает важность этого параметра. При установлении дистанции между видами при *исключении числа ядрышек* (квадрат дистанции Махаланобиса) отмечается сомнительная, с позиций современной классификации сиговых рыб [Решетников, 2010], межвидовая дивергенция: наименьшее расстояние между пелядью и муксуном (0.3), пелядью и бентофагом чиром (0.4), а между сигом-пыжьяном и чиром – 4.2, пыжьяном и муксуном – 6.0.

Таким образом, проведенный дискриминантный анализ позволил отчетливо разделить сиговых р. *Coregonus* (*Leucichthys* и *Coregonus sensu stricto*) именно в эмбриональный период, когда наиболее значимым признаком в их

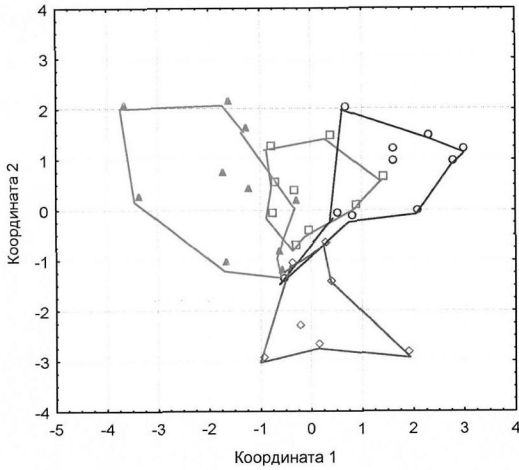


Рис. 5. Положение группировок предличинки сиговых рыб на этапе выупления в координатах полного дискриминантного анализа (без тугуна)

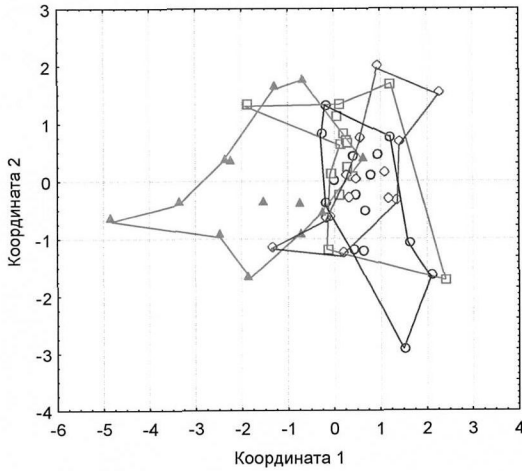


Рис. 6. Положение группировок сиговых рыб при выуплении в координатах полного дискриминантного анализа (без учета ядрышек)

разделении является число ядрышек, что отражает функциональное назначение этой структуры [Чмилевский, 1971; Каменова, 1991; Чмилевский, Каменова, 2001 и др.]. При этом на этапе выупления данный параметр (Nnl) не всегда

играет основную роль в разделении видов. В целом можно выделить три цитометрических параметра ППК, характеризующих различия этих видов как в эмбриональный период, так и на этапе вылулления: количество ядрышек, диаметр ядер и диаметр клеток.

Для установления степени связи между параметрами ППК в раннем онтогенезе разных видов был проведен *кластерный анализ*. У эмбрионов на стадии пигментации глаз отмечается низкая положительная или отрицательная связь между исследуемыми показателями. Исключением являются высокая корреляция между количеством одиночных первичных гоноцитов и их числом в составе синцитиев у сига-пыжьяна, а у пеляди – между размерами ППК и их ядер.

У предличинок сиговых рыб на стадии вылулления связь цитометрических показателей первичных гоноцитов также изменяется от очень слабой до тесной прямой и обратной. При этом параметры могут группироваться в кластеры по принципу однородности – размеры клеток, ядер, число ядрышек с одной стороны и число одиночных и объединенных в синцитии ППК – с другой, отличаться высокой скоррелированностью (чир). В пределах вида связи между параметрами могут варьировать от высоких положительных до слабых и отрицательных без отчетливой группировки по принципу однородности.

Далее проследим изменения рассмотренных выше цитометрических показателей ППК в эмбриональный период сиговых рыб в ответ на воздействие одного из наиболее токсичных нефтепродуктов – фенола.

Глава 4. Морфофункциональные изменения у эмбрионов сиговых рыб в условиях фенольной интоксикации

В наших исследованиях при оценке состояния зародышей сига и гибрида, которые продолжительное время находились в растворах фенола 0.01 мг/л (10 ПДК) и 0.02 мг/л (20 ПДК), была выявлена сходная реакция на действие возрастающих концентраций этого токсиканта.

Спустя месяц после перевода эмбрионов сига из раствора фенола повышенной концентрации (10 ПДК), где они содержались в течение месяца, в чистую воду в ядрах ППК снижается число ядрышек, а количество одиночных гоноцитов возрастает вследствие фрагментации. Синцитиальные образования включают полиморфноядерные ППК, у отдельных особей происходит распадение герминативных синцитиев и деструкция половых клеток. В целом, можно отметить парадоксальную зависимость увеличения числа, размеров и темпа формирования первичных половых клеток у зародышей сига от концентрации токсиканта. Очевидно, на данной стадии развития после месячной экспозиции сначала в среде с фенолом, а затем в чистой воде, интоксикация не оказывает существенного влияния на формирование линии половых клеток. Однако после 2-месячного пребывания в чистой воде, в благоприятных условиях аэрации, состояние зародышей ухудшается. При этом на гибрид токсикант оказывает угнетающее воздействие на поздних стадиях эмбриогенеза [Ефремова и др., 2011б]. Дальнейшее развитие зародышей при тех же концентрациях истощает ресурсы организма, и к 128-суточному возрасту большинство из них погибает.

У сига и гибрида происходит изменение соотношения разных состояний первичных гоноцитов, которое усиливается хроническим воздействием фенола. У зародышей сига при концентрации фенола 0.02 мг/л в некоторых синцитиальных образованиях отмечены дегенерирующие ППК, а сами синцитии распадаются на отдельные клетки. У гибрида отклонения проявляются в снижении цитометрических характеристик половых клеток, и хорошо заметны по состоянию ядрышкового аппарата: можно наблюдать последовательность перехода ядрышек от обычного состояния к многолопастной конфигурации с последующим пикнозом и начальными фазами дезинтеграции, что является специфичным ответом ядрышек на воздействия различных стрессорных факторов [Зацепина, 2007].

Таким образом, у зародышей даже при незначительном повышении содержания фенола в воде нерестилищ и относительно продолжительное время

находившихся в этих условиях, при последующем продолжительном освежении воды восстановления функций организма не происходит. Если они выживут и после вылупления попадут в благоприятные условия нагула, отклонения в репродуктивной системе со временем должны привести к ее дегенерации, что показано в опытах с более устойчивыми видами – карповыми [Таликина и др., 1999, 2001а].

Глава 5. Ранний гаметогенез сиговых рыб в искусственных условиях содержания

В зарегулированных условиях водной среды (УЗВ) в течение круглого года возможно поддержание необходимого температурного и гидрохимического режима, при котором рост молоди и темп гаметогенеза остаются высокими на протяжении всего периода содержания [Ивойлов и др., 2007]. Нами проведены исследования гаметогенеза тугуна и муксуна при выращивании в УЗВ [Селюков и др., 2010; Ефремова и др., 2011а].

5.1. Дифференцировка пола у муксуна в условиях искусственного содержания (УЗВ). У мальков в возрасте 31 сут. все половые клетки еще представлены ППК, а в 69 сут. у части особей отмечены первые признаки *анатомической* дифференцировки гонад по типу яичников: на их латеральной поверхности заметна инвагинация, вблизи которой под герминативным эпителием локализуются гонии (рис. 7а). Процесс анатомической дифференцировки и накопления гониального фонда у молоди продолжается, но только у 116-суточных сеголеток впервые отмечаются признаки *цитологической* дифференцировки яичников (рис. 7б). К 153-суточному возрасту структурных изменений гонад не отмечено, увеличивается количество ооцитов стадии пахитены; у части сеголеток появляются первые признаки анатомической дифференцировки гонад по типу семенников. В 212 суток у отдельных особей отмечены первые группы превителлогенных ооцитов, хотя у большинства продолжается дифференцировка яичников. Только к 283-суточному возрасту выявляются отчетливые признаки дифференцировки

семенников, в которых одиночные сперматогонии распределяются по всему объему половой железы.

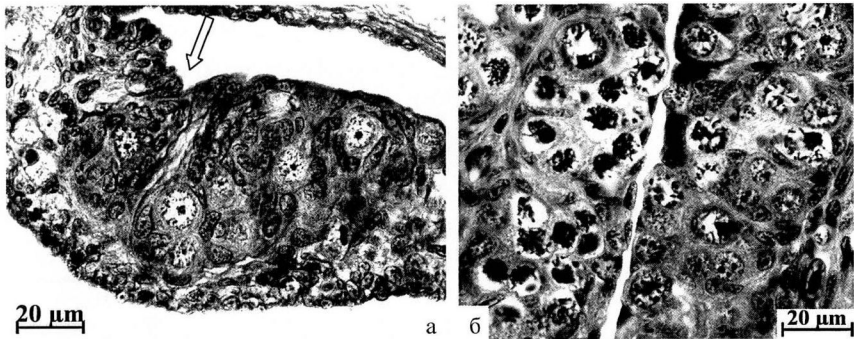


Рис. 7. Дифференцировка пола и формирование фонда половых клеток в раннем онтогенезе мускуна.

- а — начало анастомической дифференцировки гонады по типу яичников, гонии вблизи инвагинации (стрелка) герминативного эпителия; 81 сутки;
 б — цитологическая дифференцировка по типу яичников; ооциты стадий зиготены и пахитены; 116 суток.

Таким образом, дифференцировка пола на первом году жизни мускуна даже в условиях благоприятного температурного и кормового режима проходит в замедленном темпе, что позволяет считать и позднее половое созревание следствием его видовых особенностей.

5.2. Формирование фонда половых клеток у сиговых рыб с разной продолжительностью жизненного цикла. Впервые отмеченные у части самок мускуна в возрасте 212 суток, превителлогенные ооциты имеют небольшие размеры и встречаются редко, в сравнении с одновозрастными сигом и тугуном, развивавшихся в сходных условиях, притом, что размерно-весовые характеристики мускуна значительно превосходят данные показатели у этих видов (табл. 2, рис. 8а).

Дифференцировка пола у с и г а продолжается длительное время, и еще в 141 сутки у некоторых сеголеток отмечены признаки цитологической дифференцировки гонад по типу яичников: присутствуют оогонии и ооциты стадий зиготены и пахитены. У части особей в этом возрасте в яичниках уже встречаются превителлогенные ооциты. В возрасте 212 сут. у сеголеток

увеличиваются размеры гонад и количество превителлогенных ооцитов; у отдельных особей сформированы яйценозные пластинки (рис. 8б). Размеры яичников, количество и размеры ооцитов старшей генерации превосходят эти генеративные показатели у муксуна. Однако наиболее интенсивным темпом гаметогенеза отличались самки тугуна (табл. 2), старшей генерацией

Таблица 2. Соотношение половых клеток в яичниках сеголеток сиговых рыб с разным темпом гаметогенеза (212 сут.)

Показатели		Муксун	Сиг	Тугун
Параметры рыб*	Длина по Смитту, мм	146.8 ± 5.9 123 – 185	123.3 ± 3.9 103 – 141	111.6 ± 1.8 86 – 125
	Масса тела, г	35.9 ± 5.8 14.9 – 80.6	17.3 ± 1.9 9 – 28.2	14.1 ± 0.8 5.7 – 20.9
Генеративные показатели**	Площадь гонады на фронт. срезе, мм ²	0.24 ± 0.12 0.04 – 0.8	0.80 ± 0.14 0.35 – 1.08	2.21 ± 0.35 1.39 – 3.38
	Оогонии***	$12.3 \pm 1.5 (0 - 87)$ (53.6%)	$1.1 \pm 0.3 (0 - 10)$ (27.7%)	$3.1 \pm 0.7 (0 - 11)$ (32.4%)
	Зиготена	$2.5 \pm 0.7 (0 - 38)$ (11.7%)	$2.1 \pm 0.4 (0 - 18)$ (40.4%)	$0.7 \pm 0.3 (0 - 6)$ (6.1%)
	Пахитена	$9.4 \pm 1.3 (0 - 96)$ (33.3%)	$2.2 \pm 0.4 (0 - 13)$ (27.4%)	$0.4 \pm 0.2 (0 - 5)$ (2.0%)
	Ранняя диплотена	$0.4 \pm 0.1 (0 - 4)$ (1.2%)	$0.1 \pm 0.04 (0 - 2)$ (1.8%)	$5.4 \pm 0.8 (0 - 19)$ (25.9%)
	Превителлогенные	$0.2 \pm 0.1 (0 - 3)$ (0.2%)	$1.4 \pm 0.1 (0 - 5)$ (2.7%)	$12.8 \pm 1.6 (2 - 31)$ (24.0%)
	Вакуолизации	–	–	$16.2 \pm 1.5 (0 - 31)$ (9.6%)
	Диаметр ОСГ, мкм	51.9 ± 0.4 51.5 – 52.2	88.8 ± 5.9 78.3 – 110.2	247.9 ± 25.1 196.5 – 318.9
	Диаметр ядер ОСГ, мкм	32.0 ± 0.8 24.9 – 37.8	47.0 ± 0.9 26.6 – 68.2	93.5 ± 2.6 86.6 – 99.9

* Количество экземпляров муксуна – 10, сига – 10, тугуна – 13.

** Изучено на 6 особях муксуна, 5 – сига, 5 – тугуна.

*** Приводится число клеток на фронтальном срезе яичника и их доля (%) в гонаде.

половых клеток в которых были ооциты фазы вакуолизации цитоплазмы, а у одной особи яйцеклетки находились в фазе накопления мелкозернистого желтка (рис. 8в,г). В природных условиях тугун также обладает высоким темпом гонадо- и гаметогенеза, но имеет при этом низкие размерно- весовые

показатели: по размерам ниже на 38.4% по массе – на 75.2% [Богданов и др., 2006]. Как можно видеть, в условиях зарегулированного режима содержания в бассейнах УЗВ реализовались его соматический и генеративный потенциалы.

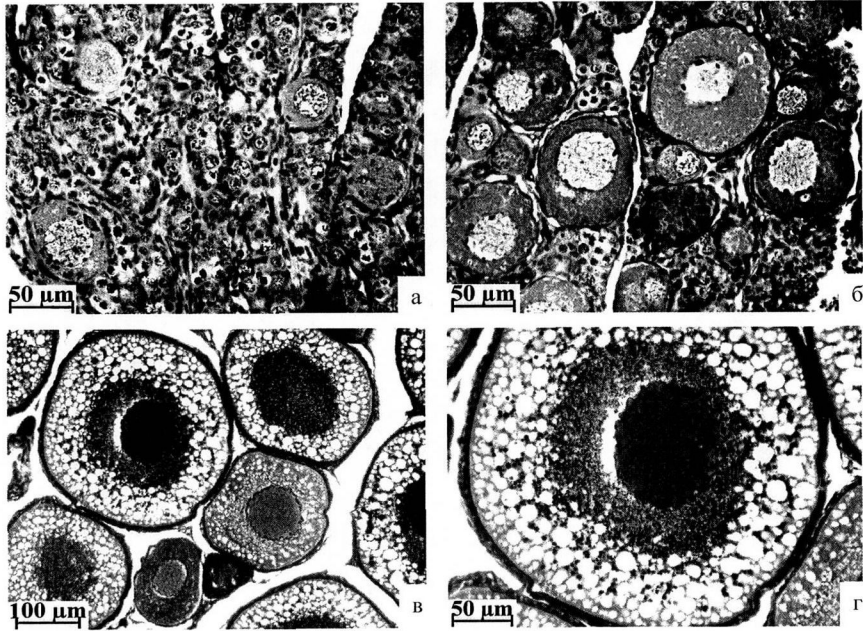


Рис. 8. Состояние яичников у одновозрастной молодежи сиговых рыб (212 сут.)
 а – участок яичника муксуна; среди ооцитов ранней профазы мейоза встречаются мелкие првителлогенные ооциты;
 б – в яичнике сига между првителлогенными ооцитами распределяются многочисленные гнезда ооцитов стадий зиготены и пахитены;
 в – в яичнике тугуна между вителлогенными ооцитами встречаются одиночные ооциты периода првителлогенеза;
 г – то же увеличено; вителлогенный ооцит в фазе накопления мелкозернистого желтка.

Таким образом, при содержании в контролируемых условиях молодежи сиговых рыб с разным темпом индивидуального развития, при относительно высоком соматическом росте, в сравнении с таковым в условиях естественного ареала, отчетливо проявилась видоспецифичность в уровне развития репродуктивной системы, что необходимо учитывать при формировании маточных стад сиговых рыб индустриального типа.

ВЫВОДЫ

1. Цитоморфологические и цитометрические различия первичных гоноцитов в период эмбрионального развития у разных видов сиговых рыб в идентичных условиях развития обусловлены видовыми особенностями – наибольший диапазон морфофункционального состояния ППК у тугуна, наименьший – у пеляди.

2. При оценке межвидовых различий эмбрионов сиговых рыб по цитометрическим параметрам ППК их значимость снижается в следующем порядке: число ядрышек, диаметр ядра, диаметр клетки, число синцитиальных образований, число ППК; на этапе вылупления число ядрышек не всегда занимает лидирующее положение.

3. Среди предличинок сиговых рыб тугун и пелядь по совокупности цитометрических параметров ППК отчетливо дискриминируется от муксуна, сига-пыжьяна и чира, что на цитоморфологическом уровне может подтверждать таксономическую подразделенность сиговых рыб рода *Coregonus*.

4. У сиговых рыб как в эмбриональный период, так и на ранних стадиях постэмбрионального онтогенеза связи большинства цитометрических показателей ППК с числом синцитиальных образований не выявляется.

5. Влияние раствора фенола на эмбрионов сига и его гибрида с рипусом характеризуется пролонгированным эффектом даже после перевода их в чистую воду; наибольшие патоморфологические изменения проявляются в дегенерации ППК, которая начинается с деструкции ядрышек, в наибольшей степени выявленной у гибрида.

6. Определение пола у муксуна в благоприятных условиях содержания УЗВ продолжается 4-9 месяцев: анатомическая дифференцировка гонад по типу яичников проходит в 70-96 суток, цитологическая – в 115-212 суток; дифференцировка семенников задерживается до 8-9 месяцев.

7. Уровень развития гонад и темп оогенеза у сеголеток сиговых рыб с разной продолжительностью жизненного цикла при содержании в

регулируемых условиях УЗВ существенно возрастает в направлении длинноцикловый муксун → среднецикловый сиг → короткоцикловый тугун, отражая специфику гонадо- и гаметогенеза этих видов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Селюков А.Г., Ефремова Е.В., Бондаренко Г.Н. Цитоморфологические преобразования первичных половых клеток в эмбриогенезе муксуна *Coregonus muksun* (Pallas) // Вестник Тюменского государственного университета. Тюмень. 2010. №3. Медико-биологические науки. Науки о земле. Химия. С. 45-51.

2. Селюков А.Г., Шуман Л.А., Ефремова Е.В. Применение установок замкнутого водоснабжения для формирования маточных стад сиговых рыб (на примере тугуна) // Вестник Тюменского государственного университета. Тюмень. 2010. №. 7. Медико-биологические науки. Науки о земле. Химия. С. 122-129.

3. Ефремова Е.В., Селюков А.Г., Шуман Л.А. Особенности дифференцировки пола и формирование половых клеток в раннем онтогенезе муксуна *Coregonus muksun* (Pallas) // Вестник Тюменского государственного университета. Тюмень. 2011. №6. Медико-биологические науки. С. 46-55.

4. Ефремова Е.В., Моисеенко Т.И., Селюков А.Г., Гоголева С.Ю. Морфо-функциональные нарушения у эмбрионов сиговых рыб в условиях фенольной интоксикации // Вестник Тюменского государственного университета. Тюмень. 2011. №. 12. Экология. С. 38-46.

Публикации в прочих изданиях

5. Selyukov A.G., Efremova E.V., Bospomestnykh G.N. Primordial germ cells proliferation in coregonid embryos // X Intern. Symposium on Biology and Manager of Coregonid Fishes. Canada, Winnipeg. 2008. P. 58.

6. Селюков А.Г., Беспоместных Г.Н., Ефремова Е.В. Проблема пролиферации первичных гоноцитов в эмбриогенезе (на примере сиговых рыб)

// Труды Междунар. форума по проблемам науки, техники и образования. М. 2008. Т.3. С.58-60.

7. Селюков А.Г., Беспоместных Г.Н., **Ефремова Е.В.**, Шуман Л.А., Читаева Е.А. Инновации в пресноводной аквакультуре: автоматизированный рыбоводный модуль // Тезисы докл. научно-практич. конф. «Пресноводная аквакультура: состояние, тенденции и перспективы развития». Тюмень. 2008. С. 93-95.

8. **Ефремова Е.В.** Формирование линии половых клеток в эмбриогенезе сиговых рыб разных эколого-морфологических групп // Материалы II Всероссийской научно-практич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Полевые и экспериментальные исследования биологических систем». Ишим. 2009. С. 53-55.

9. Беспоместных Г.Н., **Ефремова Е.В.**, Карасева Т.В., Шуман Л.А. Оценка состояния репродуктивной системы и печени тугуна (*Coregonus tugin*) в условиях установки замкнутого цикла // Тезисы докладов I конференции молодых ученых НАСБЕ «Вопросы аквакультуры». Тюмень. 2009. С.3-4.

10. Селюков А.Г., **Ефремова Е.В.**, Беспоместных Г.Н., Симонова А.В. Пролиферативная активность герминативных стволовых клеток в эмбриогенезе сиговых рыб // Материалы 7 Междунар. научно-производств. совещ. по биологии и биотехн. разведения сиговых рыб. Тюмень. 2010. С. 144-149.

11. Селюков А.Г., Шуман Л.А., **Ефремова Е.В.**, Беспоместных Г.Н. Применение УЗВ для формирования маточного стада сиговых рыб (на примере тугуна) // Материалы 7 Междунар. научно-производств. совещ. по биологии и биотехн. разведения сиговых рыб. Тюмень. 2010. С.250-254.

12. **Ефремова Е.В.**, Пашина Л.С. Влияние временной фенольной интоксикации на формирование линии половых клеток в эмбриональный период рыб р. *Coregonus* // Материалы Всеросс. конф. с междунар. участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов». Борок. 2012. С. 133-136.

Подписано в печать 27.02.2013
Объем 1,5 п.л.
Тираж 100 экз.
Заказ № 209