

На правах рукописи



003057348

МИКУЛИНА
Юлия Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНОМАЛЬНЫХ ООЦИТОВ
У КЕТЫ И ГОРБУШИ В СВЯЗИ С ИХ ИСКУССТВЕННЫМ
ВОСПРОИЗВОДСТВОМ**

Специальность 03.00.32 – биологические ресурсы

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена на кафедре биоэкологии и ихтиологии Московского государственного университета технологий и управления (МГУТУ)

- Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Никифоров-Никишин Алексей Львович,
Московский государственный университет
технологий и управления, г. Москва
- Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Демкина Наталья Викторовна,
Дмитровский филиал Астраханского
государственного технического университета,
пос. Рыбное Московской области
- кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Белова Наталья Васильевна,
Биологический факультет Московского
государственного университета им. М.В. Ломоносова,
г. Москва
- Ведущее учреждение: Всесоюзный научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО),
г. Москва

Защита состоится 18 мая 2007 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 212.122.06 при Московском государственном университете технологий и управления по адресу: 117149, г. Москва, ул. Болотниковская, д. 15. Тел./Факс 317-29-27, 317-29-36.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государственного университета технологий и управления.

Автореферат разослан «16» апреля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.Г. Фельдман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Кета *Oncorhynchus keta* и горбуша *O. gorbuscha* относятся к наиболее важным в промысловом отношении водным биологическим ресурсам российского Дальнего Востока. По их искусственному воспроизводству Сахалинская область является в России самым успешным регионом, обеспечивая дополнительно около четверти уловов тихоокеанских лососей. В настоящее время здесь функционируют более 30 лососевых рыбоводных заводов (ЛРЗ), которые ежегодно выпускают более 600 млн. экз. молоди (Любаева, 2002; Маслова и др., 2004; Микодина и др., 2006). Столь мощное заводское разведение требует постоянного контроля качества половых продуктов производителей с целью повышения эффективности инкубации икры и работы лососевых рыбоводных заводов в целом.

На основе заложенных в 1960-80 гг. биологических основ искусственного воспроизводства тихоокеанских лососей были созданы инструкции по их разведению, разработаны и один раз в пять лет обновляются «Временные биотехнические нормативы...» (1999). На Сахалине биотехнику разведения тихоокеанских лососей также постоянно совершенствуют (Воловик, 1966; Иванков, 1972; Рухлов, 1983; Канидьев, 1984, 1990; Хоревин, 1984; Вялова, 2000; Тарасюк, 2005).

Вопросы взаимодействия этих рыб с внешней средой, в том числе при различных патологиях, детально исследованы лишь у покатной молоди, что определяется насущными задачами рыбоводной практики (Краюшкина и др., 1982; Вельтищева, 1983; Краюшкина, Левченко, 1983; Смирнов, Кляшторин, 1989; Микулин и др., 2005). В отличие от этого, свойства и строение ооцитов и икринок лососей р. *Oncorhynchus* в норме и, особенно, при нарушениях изучены крайне мало (Наточин, Бочаров, 1962; Смирнов, 1975; Гриценко и др., 2001; Пукова, 2002). Еще в середине прошлого столетия у кеты были обнаружены единичные ооциты с аномалиями строения, названные «горохом», т.к. они имели повышенный тургор, были крупнее и прозрачнее нормальных (Дислер, 1957; Смирнов, 1975). В конце 90-х гг. на ЛРЗ Сахалина существенно

увеличилось число самок лососей, имеющих в яичниках высокую долю такой аномальной икры (Гриценко и др., 2001; Пукова, 2002; Микулин, Любаева, 2003; Mikulin, Lyubaeva, 2003). Причиной ее возникновения в яичниках лососей ранее считали попадание воды из внешней среды к ооцитам гонад открытого типа, однако, экспериментально это не было подтверждено.

В настоящее время практически остались неизвестными функциональные особенности «гороха», его количество, локализация в яичнике, жизнеспособность. Не выяснены причины его образования и не разработаны способы отделения от нормальной икры. Для решения новых биотехнических, технологических и нормативных проблем искусственного воспроизводства тихоокеанских лососей потребовалось детальное изучение этих вопросов.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – оптимизация искусственного воспроизводства промысловых водных биологических ресурсов - кеты и горбуши, в условиях лососевых рыбоводных заводов Сахалина.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. изучить морфологические особенности аномальной икры типа «горох» у самок кеты и горбуши;
2. провести гистологическое изучение особенностей строения аномальных ооцитов;
3. выяснить способность аномальной икры к оплодотворению и развитию;
4. оценить количество аномальных ооцитов у разных самок и их локализацию в яичниках;
5. исследовать динамику встречаемости самок горбуши и кеты с «горохом» в период их нерестовой миграции к базовым рекам рыбоводных заводов о. Сахалина, расположенных в его разных регионах;
6. изучить физиологические характеристики аномальной икры типа «горох»;
7. установить причины образования в яичниках самок тихоокеанских лососей аномальной икры;
8. разработать методы отделения аномальных икринок от нормальных для

применения при искусственном воспроизводстве.

Научная новизна. Впервые показано, что аномальная икра типа «горох» крупнее и прозрачнее нормальных яйцеклеток, однако ее плотность снижена. Впервые изучены особенности строения аномальной икры типа «горох», подтверждающие ее нежизнеспособность. Показано, что в условиях рыбоводных заводов о. Сахалин наибольшее количество самок кеты и горбуши с аномальными ооцитами встречается на юго-западном и юго-восточном побережьях. Установлено, что у самок тихоокеанских лососей можно искусственно вызвать преобразование нормальных ооцитов в яичниках IV стадии зрелости в аномальные ооциты как *in vivo* после введения им раствора трехвалентного железа в количестве 100 мг на самку, так и *in vitro* путем воздействия на ооциты или икру трехвалентного железа (FeCl_3) или меди (CuSO_4).

Практическая значимость. Предложены способы отделения ооцитов типа «горох» от нормальных как в процессе разведения лососей, так и при получении пищевой икры. Показана безопасность метода отделения «гороха» от развивающейся икры для ее дальнейшей инкубации. Даны рекомендации по выдерживанию самок лососей перед нерестом, соблюдение которых предотвращает появление в их яичниках аномальных ооцитов типа «горох». Установлена необходимость увеличения норматива резерва самок.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на коллоквиумах кафедры биоэкологии и ихтиологии МГУТУ в 2005-2006 гг., международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных» (Саранск, 2005), международной научно-практической конференции «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов» (Москва, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Образование «гороха» - естественный процесс, не зависящий от деятельности человека, хотя она может этому способствовать.

2. Образованию «гороха» в яичниках тихоокеанских лососей способствуют три основных фактора – перезревание самок, дефицит кислорода и наличие в воде солей металлов.
3. Аномальные ооциты типа «гороха» являются адаптацией для выноса из нерестовых гнезд нежизнеспособных икринок и регуляции численности лососей.
4. При искусственном воспроизводстве и в пищевой промышленности «горох» и нормальные ооциты разделяются разными методами.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 10-ти разделов: введение, 6 глав, выводы, практические рекомендации, список литературы. Работа изложена на 121 странице текста, содержит 29 рисунков и 29 таблиц. В списке использованной литературы 139 источников, в том числе 17 на иностранных языках.

Глава 1. Материалы и методы исследования

Объектами исследования послужили самки двух видов тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*: горбуша и кета. Сбор материала в период 2001-2006 гг. осуществлен на 10-ти ЛРЗ о. Сахалин (рис. 1).



Рисунок 1 - Лососевые рыбодоводные заводы о. Сахалин, где собран материал для исследования, и места их расположения на территории острова. 1 – Адо-Тымовский, 2 - Побединский, 3 – Березняковский, 4 - Залом, 5 – Соколовский, 6 – Лесное, 7 – Охотский, 8 – Ясноморский, 9 – Сокольниковский, 10 – Калининский

Эксперименты с горбушей проведены на ЛРЗ «Лесное», кетой - на Охотском.

Определяли массу и плотность нормальных и аномальных ооцитов типа «горох» (далее – «горох»), овулировавших, оплодотворенных и набухших икринок. Часть материалов по числу самок кеты с «горохом» в яичниках предоставлены рыбододами «Сахалинрыбвода» под руководством Т.Н. Любаевой, за что приносим им глубокую благодарность. Оценивали качество ооцитов у 100 самок в начале, середине и конце нереста, выражая в процентах число самок с аномальными ооцитами типа «горох» в их яичниках.

Объем обработанного материала представлен в табл. 1.

Таблица 1 - Объем собранного и обработанного материала

Показатели	Число заводов	Число рыб, экз.	Число измерений	Число опытов
Самки с аномальной икрой типа «горох»	10	3269	51	-
Определение массы ооцитов в разных частях гонады	1	4	323	-
Взвешиваний икры и «гороха» после овуляции и в процессе набухания	2	25	1995	15
Влияние на ооциты солей и веществ с различной молекулярной массой	2	34	7800	34
Гистология ооцитов	1	3	45	-

Для гистологического анализа материал фиксировали в 4%-ном формальдегиде; его обработка проведена во ВНИРО, канд. биол. наук – М.А. Седовой и О.Г. Полуэктовой, за что их также глубоко благодарим. Механизм возникновения аномальных ооцитов типа «горох» исследовали *in vivo* – внутригонадными и внутримышечными инъекциями растворов двухвалентного (FeSO_4) и трехвалентного (FeCl_3) железа, передержкой самок, и *in vitro* – выдерживанием фрагментов яичников в растворах NaCl , плазме крови самок, а также FeSO_4 , FeCl_3 , CuSO_4 , ZnSO_4 . Влияние перезревания самок горбуши на образование «гороха» оценивали при выдерживании рыб в бассейне с круговым током воды в течение 10 сут., а также в речном садке в течение 8 сут. Плотность и набухание икринок изучали, используя вещества с возрастающей

молекулярной массой: хлорид натрия (М-58), глицерин (М- 98) и сахарозу (М-352), а проницаемость - используя эти же вещества и раствор метиленового синего (М-284). При работе с самками использовали анестетик "гвоздичное масло". Материалы обработаны с использованием пакета прикладных программ для персонального компьютера Excel.

Глава 2. Структура и водный обмен икринок лососей (обзор литературы)

Приведены сведения о размерах и строении ооцитов у тихоокеанских лососей. Описан процесс образования перивителлинового пространства и особенности водно-солевого обмена в яйцеклетках лососей и других видов рыб. Приведен перечень веществ, проникающих через оболочки икринок: NaCl, HgCl₂, KCN, LiCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, SrCl₂, сахара, красители, моносахара и аминокислоты. Проанализированы известные сведения об аномальных икринках типа «горох» в яичниках тихоокеанских лососей и частоте их встречаемости.

Глава 3. Морфофизиологические характеристики, распределение в яичнике и встречаемость у самок лососей ооцитов типа «горох»

Выявлено два основных вида аномальных икринок типа «горох»: крупный и мелкий, а также некоторые другие. Установлено, что образование аномальных икринок типа «горох» происходит в три этапа. На первом - в ооцитах исчезают кортикальные гранулы, образуется перивителлиновое пространство и обводняется желток. Увеличивается масса, прозрачность и тургор яйцеклетки, что приводит к растяжению яйцевой оболочки и увеличению ее жесткости без затвердения. Жировые капли укрупняются и концентрируются в верхней части желтка. На втором - желток резорбируется, а его остатки скапливаются под жировыми каплями в виде ватообразной массы. Прозрачность такого ооцита возрастает, размеры сильно увеличены. На третьем этапе завершается разрушение аномальных яйцеклеток. Сначала в ястыках обнаруживаются лишь пустые оболочки яйцеклеток, затем и они резорбируются.

На гистологических срезах (рис. 2) видно, что у неовулировавшего

аномального ооцита типа «горох» желток гомогенен, его наружный слой уплотнен и разрушен; кортикальные гранулы опустошены и в большинстве деформированы, а их содержимое излито как под яйцевую оболочку, так и в желток; плазменная часть не концентрируется на анимальном полюсе, перивителлиновое пространство имеется, оболочка ооцита не имеет поперечной исчерченности, фолликулярный слой от нее отделен. Эти признаки показывают, что «горох» не способен не только развиваться, но даже оплодотвориться из-за наличия на его поверхности слоя фолликулярных клеток, имеющегося перивителлинового пространства, разрушения желтка и цитоплазматических структур.

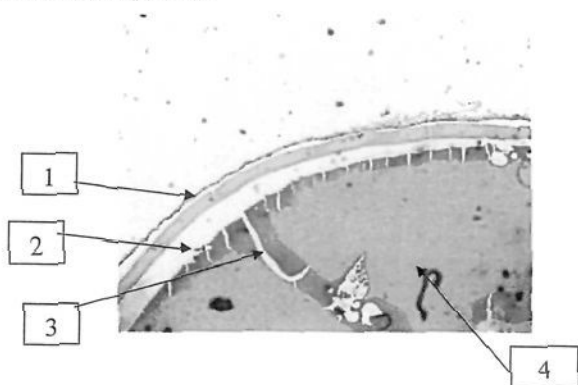


Рисунок 2 - Поперечный срез аномального ооцита горбуши типа «горох». 1 – фолликулярная оболочка, 2 - перивителлиновое пространство, 3 – опустошенные кортикальные гранулы, 4 - резорбирующийся желток. Ув.: 10 × 10.

Наблюдения за развитием оплодотворенной, неоплодотворенной и аномальной икры типа «горох» разных форм в течение 30 сут подтверждают, что «горох» не обладает жизнестойкостью и весь гибнет в первые сутки. Однако, если из смеси нормальной икры и «гороха» последний отделить, то оставшая икра успешно развивается. Таким образом, «горох», как ооцит в состоянии резорбции, нежелательно использовать в рыбоводных целях. Его удаление до закладки на инкубацию позволит повысить выживаемость оставшей икры в процессе ее инкубации из-за отсутствия необходимости частой переборки икры в процессе ее эмбрионального развития, приводящей к

травматизму нормально развивающейся икры.

Установлено, что «горох» крупнее нормальных ооцитов у горбуши на 30%, у кеты – на 57% (табл. 2), но несколько меньше по плотности (табл. 3).

Таблица 2 - Масса овулировавших ооцитов, набухшей икры и «гороха» у двух видов тихоокеанских лососей

Масса, мг	Виды рыб	
	кета	горбуша
Ооциты		
n	15	10
$\frac{M \pm m}{lim}$	$\frac{229,2 \pm 32,47^*}{174,0-291,0}$	$\frac{139,4 \pm 1,28^*}{132,0-145,0}$
Набухшая икра		
n	25	18
$\frac{M \pm m}{lim}$	$\frac{265,9 \pm 37,75^*}{188,0-325,0}$	$\frac{171,1 \pm 3,45^*}{144,0-203,0}$
«Горох»		
n	15	8
$\frac{M \pm m}{lim}$	$\frac{356,8 \pm 54,44^*}{230,0-409,0}$	$\frac{181,9 \pm 1,86^*}{177,0-193,0}$

Различия достоверны при $p < 0,01$

Таблица 3 - Плотность различных яйцеклеток тихоокеанских лососей, г/см³

Типы яйцеклеток	Вид	
	горбуша	кета
Овулировавшая	1,080-1,091	1,084-1,090
Оплодотворенная набухшая	1,070	1,076-1,080
Крупный «горох»	1,021-1,070	1,048-1,076
Мелкий «горох»	1,084-1,088	нет данных

В яичниках разных самок кеты месторасположение, встречаемость и количество «гороха» различны. Например, выявлены яичники с «горохом» в каудальной, передней части, многочисленный «горох», единичный «горох». Оценка частоты встречаемости самок с разным количеством и различным распределением по объему гонад икринок разного типа (табл. 4) показала, у кеты из р. Ударница их число составляет примерно половину. В выборках исследованных нами самок преобладают особи, в ястыках которых «горох» единичен, но есть рыбы (1-2%), в гонадах которых вся икра состоит из «гороха». Динамика встречаемости самок с различными формами «гороха» в

яичниках горбуши и кеты в период сбора икры на инкубацию на ЛРЗ «Лесное» и Охотском (рис. 3) имеет много общего. У обоих видов от начала к середине

Таблица 4 - Разнокачественность зрелой икры у кеты из р. Ударница

Показатели	25 сентября		26 сентября		29 сентября	
	самок		самок		Самок	
	шт.	гор.,%	шт.	гор.,%	шт.	гор.,%
Нормальная икра	131	53,7	323	44,1	97	51,0
Единичный «горох»	79	32,4	328	44,7	78	41,0
«Горох» более 4%	21	8,6	42	5,7	10	5,2
Вся гонада состоит из «гороха»	5	2,1	8	1,1	5	2,6
«Горох» мелкий	1	0,4	2	0,3	0	0
Нормальная икра с остатком «гороха» в ястыках	3	1,2	2	0,3	2	1,0
Нормальная жесткая икра	2	0,8	21	2,8	0	0
«Горох» крупный, мягкий	1	0,4	0	0	0	0
Единичный «горох» в ястыках IV стадии зрелости	1	0,4	7	1,0	0	0
Всего самок с «горохом»	244	45,1	733	52,7	192	49,5

Примечание: гор. – самки с икрой типа «горох» в яичнике

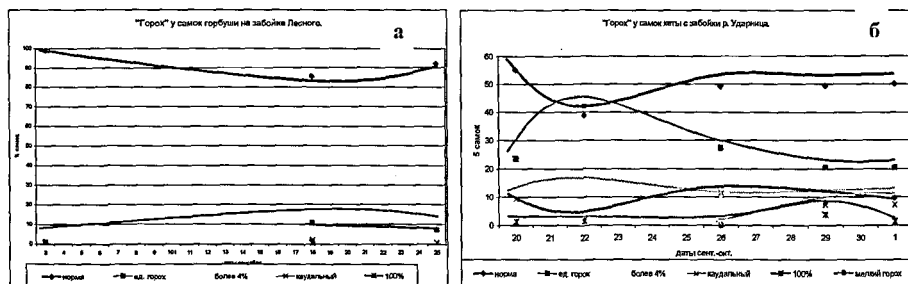


Рисунок 3 - Динамика доли ооцитов типа «горох» в оволировавшей икре горбуши на ЛРЗ «Лесное» (а) и Охотском (б)

нерестовой кампании снижается доля самок с нормальной икрой, а с «горохом», соответственно, возрастает. К концу периода размножения число самок с нормальной икрой вновь возрастает. Последнее обстоятельство указывает на вероятность усиления резорбции икринок к концу нерестового сезона. Проведена экспериментальная проверка данного предположения. Самок

из одной выборки разделили на две группы: в одной сразу же оценили количество «гороха» - он оказался у всех рыб практически 100%-ным. В другой - яичники проверили через несколько дней и «гороха» практически не найдено, даже пустые оболочки встречались редко. Таким образом, экспериментально подтверждена резорбция аномальных ооцитов типа «горох».

В свою очередь доля самок с мелким горохом и повышенной степенью обводненности овариальной жидкости в гонадах увеличивается к концу нерестового сезона, что, во-первых, указывает на взаимосвязь перезревания самок и образования в их гонадах нарушений типа «мелкий горох», во-вторых, - на различия в этиологии возникновения крупного и мелкого «гороха». Следует также отметить, что максимальный процент самок с «горохом» у горбуши из р. Очепухи (ЛРЗ «Лесное») не превышал 15%, в то время как у кеты из р. Ударница (Охотский ЛРЗ) он был около 60%. Столь высокие различия у этих двух видов лососевых рыб, на наш взгляд, обусловлены различиями абиотических условий в этих двух реках.

Изучение наличия аномальных икринок типа «горох» у самок кеты на других лососевых рыболовных заводах о. Сахалин показало, что только на Побединском ЛРЗ самок с такой икрой в период проведения исследований не было обнаружено. На остальных ЛРЗ (северо-восток, юго-восток, юго-запад острова) самки кеты с «горохом» имеются, причем на всех заводах их процент увеличивается от начала к концу нерестовой кампании. Максимальная доля самок с «горохом» к концу нерестовой кампании отмечена на Калининском ЛРЗ и составила 66%. На остальных ЛРЗ этот показатель был меньшим, но также высоким: на Охотском – 61%, Лесном - 49%, Ясноморском – 49%, Березняковском – 43%, Соколовском – 39%, Адо-Тымовском – около 29%, Заломе – 23% и на Сокольниковском – 22%.

Отметим, что на всех заводах, где отмечали самок с аномалиями ооцитов, от начала нерестового хода кеты к концу наблюдали увеличение количества «гороха» среди икры одной самки. При этом в начале хода преобладают самки с единичным «горохом» в яичниках, их сменяют рыбы с 4-

5%-ным и каудальным, и к концу нерестового хода появляются самки с многочисленным мелким и 100%-ным крупным «горохом».

На 6-ти ЛРЗ – Адо-Тымовском, Лесном, Охотском, Ясноморском, Сокольниковском и Калининском, проведен анализ роли различных факторов внешней среды, которые могли бы способствовать возникновению у самок кеты «гороха», таких как температурный режим, рН, содержание кислорода в воде и осадки. Четких зависимостей не обнаружено. Тем не менее, выявлена тенденция к возрастанию доли самок кеты с аномальными икринками типа «горох» через несколько дней после выпадения дождей и при выдерживании рыб в садках, относительно только что подошедших особей. Мы пришли к заключению о возможном влиянии на исследуемый процесс трех факторов: перезревания рыб к концу нерестового хода; повышенной плотности рыб при выдерживании в садках; увеличение неизвестных провоцирующих веществ в воде реки после дождей.

Глава 4. Причины возникновения аномальных ооцитов типа «горох»

Ранее считали, что у лососей с открытым типом яичника образование «гороха» вызывает вода, попавшая в полость тела через генитальное отверстие (Дислер, 1957; Смирнов, 1975). В этом случае вода должна в первую очередь активировать и превращать в «горох» икринки, расположенные в ближайшем к месту попадания воды участке яичника. Однако этого не наблюдается. У части самок тихоокеанских лососей вся гонада полностью заполнена икринками типа «горох», или он находится в передней части яичника, или единичные икринки «гороха» беспорядочно расположены по всей гонаде. Это привело к необходимости дополнительного изучения возможных причин образования аномальных ооцитов.

Выдерживание фрагментов яичников с ооцитами IV стадии зрелости в воде с соленостью от 0 до 5‰ (NaCl) в течение 5,5 ч не привело к набуханию ооцитов и не увеличило жесткость их оболочек. Это подтверждает, что «горох» возникает не под воздействием воды, попавшей в полость тела самки, что объяснимо наличием у ооцита фолликулярной оболочки, защищающей его от

воздействия среды. Другое предположение, что «горох» образуется в результате кровоизлияний в отдельных фолликулах, также не подтвердилось, поскольку образование «гороха» из нормальных ооцитов «in vitro» не происходит (табл. 5) при помещении ооцитов кеты в свежую кровь их самок, плазму крови или растворы NaCl, изоосмотичные плазме крови.

Таблица 5 - Влияние на ооциты кеты солевых растворов разной концентрации и плазмы крови самок кеты в процессе набухания

Раствор NaCl, ‰	Жесткость оболочки икринки	Прозрачность оболочки икринки
0	жесткая	нормальной белёсости
2,5	полужесткая	чуть прозрачная
5,0	мягкая	значительно прозрачнее
7,5	мягкая	прозрачная
10,0	мягкая	прозрачная
плазма крови	чуть жестковатая	прозрачная

Так как «горох» - это ооцит, в котором отсутствуют кортикальные гранулы, мы предположили, что причиной его образования является преждевременное разрушение этих гранул, в результате которого их содержимое изливается не только между мембраной яйца и оболочкой, но и в желток. Разрушение мембран кортикальных альвеол может происходить свободнорадикальном перекисном окислении их полиненасыщенных жирных кислот, провоцируемом негеминовым железом (Козлов, 1969; Владимиров, Арчаков, 1972; Магомедов, Чернышов, 1975; Барабой и др., 1991; Фролькис, Мурадян, 1992). Мы предположили, что одной из причин образования «гороха» в яичниках лососей может быть высокое содержание соединений железа в приповерхностных грунтовых водах и реках Сахалина, которое превышает предельно-допустимые концентрации в 10-40 раз.. Это косвенно подтверждают увеличение числа самок с «горохом» после сильных дождей или при их длительном выдерживании в речных садках, а также гибель самок со 100%-ным «горохом», зашедших в реки с ярко-коричневой водой. Для подтверждения этой гипотезы в полость гонад самок горбуши IV стадии зрелости инъецировали растворы различных форм железа. Установлено (табл. 6), что

Таблица 6 - Влияние введения в гонады самок горбуши двух- и трехвалентного железа на образование «гороха»

№ самки	Введенное вещество	Концентрация, мг/мл	Введено		Наличие "гороха"
			мл	мг	
1	FeSO ₄ x 7H ₂ O	1	1	1	нет
2	FeSO ₄ x 7H ₂ O	1	10	10	нет
3	FeCl ₃ x 6H ₂ O	10	1	10	нет
4	FeCl ₃ x 6H ₂ O	10	10	100	единичный

трехвалентное железо может вызвать образование «гороха» при ведении в количестве не менее 100 мг на самку. При повторном введении незрелой самке № 1 в гонаду 1 мл FeCl₃ x 6H₂O в концентрации 100 мг/мл через сутки среди ее овулировавшей из каудальной части гонады икры обнаружен единичный «горох», а неовулировавшая передняя часть обеих гонад состояла исключительно из «гороха». Исследовано также влияние (табл. 7) на

Таблица 7 - Влияние внутримышечного инъектирования самкам горбуши растворов солей двух- и трехвалентного железа на образование «гороха»

12.09.01			13.09.	15.09.	18.09.	24.09.
№	Соль, концентрация	мл	наличие «гороха»			
1	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	1	-	34 шт.	-	-
2	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	1	-	-	нет	-
3	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	1	-	-	1 шт.	-
4	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	1	-	-	-	нет
5	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	3	IV ст. зрел., нет	-	-	-
6	FeSO ₄ x 7H ₂ O(10мг/мл)	3	-	-	нет	-
7	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	1	-	нет	-	-
8	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	1	-	-	нет	-
9	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	1	-	-	нет	-
10	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	1	-	-	-	нет
11	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	3	Множественный, мелкий	-	-	-
12	FeCl ₃ x 6H ₂ O(100мг/мл)	3	5%, крупн.	-	-	-

образование «гороха» растворов солей двух- и трехвалентного железа после внутримышечного введения самкам. Высокие концентрации трехвалентного железа уже через сутки привели к возникновению «гороха», а двухвалентное

железо - на третьи сутки. Эти данные еще раз подтвердили важную роль трехвалентного железа в возникновении «гороха» в гонадах лососевых рыб.

Экспериментально проанализировано влияние ионов металлов с различной валентностью на возникновение «гороха» *in vitro*. Исследование влияния трехвалентного железа в различных концентрациях на образование «гороха» из ооцитов горбуши и кеты, взятых из средней части гонады самок, показало, что через сутки только в контроле (7‰ раствор NaCl) и растворе FeCl₃ концентрацией 100 мг/л ооциты остались неизменными. Во всех остальных более высоких концентрациях FeCl₃ (рис. 4) возник «горох», причем его размеры различались в зависимости от концентрации в растворе железа. При этом у кеты, по мере увеличения концентрации трехвалентного железа, возрастает масса икринки, в то время как у горбуши она в этом случае сначала увеличивается, а при самых высоких – уменьшается. Снижение массы икры горбуши при высоких концентрациях железа, возможно, может быть связано с влиянием осмотичности самой соли железа на фоне наличия в растворе 7‰-ной поваренной соли, а также меньшего объема икринки горбуши относительно кеты.

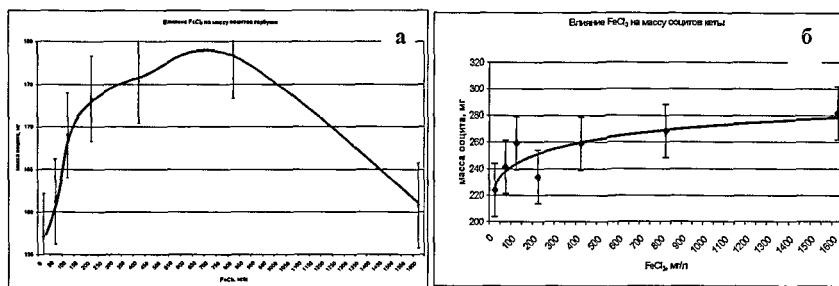


Рисунок 4 - Изменение массы ооцитов горбуши (а) и кеты (б) в зависимости от содержания трехвалентного железа в растворе

По той же схеме исследовано влияние ионов других металлов меди и цинка, количество которых в реках Сахалина также часто превышает ПДК. Исследовали действие растворов солей CuSO₄, ZnSO₄ на образование «гороха» из ооцитов кеты в сравнении с солями двух- и трехвалентного железа (рис. 5).

Через 8 ч в высоких концентрациях растворов солей FeCl_3 и CuSO_4 произошло образование «гороха» с достоверным увеличением массы ооцитов. Более того, медь сильнее индуцировала образование «гороха», чем железо.

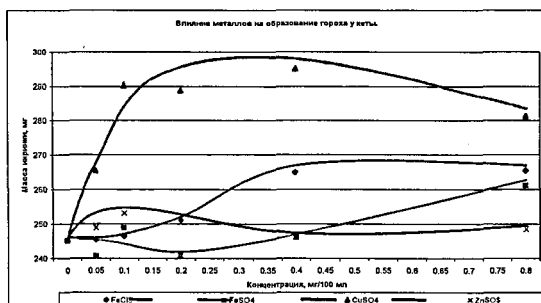


Рисунок 5 - Влияние меди, цинка, двух- и трехвалентного железа на возникновение «гороха» у кеты

Для изучения роли перезревания самок в возникновении «гороха» их выдерживали в речном садке в течение 8-ми сут, после чего у 50% самок в яичниках обнаружены 100%-ный мелкий «горох» и повышенное содержание овариальной жидкости. Выдерживание самок горбуши в круговом бассейне в течение 10 дней привело к образованию у 50% самок мелкого «гороха» и увеличению объема овариальной жидкости. Таким образом, передержка рыб приводит к их перезреванию с образованием многочисленного мелкого «гороха» и увеличению объема овариальной жидкости. Это, видимо, вызвано примитивностью осморегуляции производителей в пресной воде и снижением содержания солей в их крови ниже 5‰ (Микулин, Любаева, Любаев, 2003).

Глава 5. Разработка методов удаления аномальных ооцитов типа «горох»

Для разработки биологических основ разделения нормальных и аномальных ооцитов изучены изменения их плотности, проницаемости оболочек и особенности набухания в растворах различных веществах с возрастающей молекулярной массой: хлорида натрия, глицерина, метиленового синего и сахарозы. Изучение набухания икры разного качества в глицерине и метиленовой сини показали неприемлемость использования растворов этих

веществ для ее разделения, т.к. первый сильно обезвоживает нормальную икру, а второй не проникает в собственно ооцит. Однако эти опыты позволили показать, что молекулы сахарозы - вещества с большей молекулярной массой, чем у метиленовой сини, также не должны при жизни ооцита проникать в желток, и, следовательно, не будут нарушать процесс эмбриогенеза.

Плотность ооцитов и «гороха» (табл. 8) при их набухании в растворе сахарозы различается. По этому признаку выявлено, что для отделения «гороха» от нормальных ооцитов кеты оптимальной является концентрация сахарозы, равная 200 г/л, что соответствует плотности «гороха» 1,08 г/см³.

Таблица 8 - Плотность ооцитов, набухшей икры и «гороха» кеты в растворах сахарозы разной концентрации

сахар, г/л	плотность, г/см ³	распределение по плотностям, шт		
		ооциты	набухшая икра	горох
80	1,032			
90	1,036			
100	1,04			▼
110	1,044			0
120	1,048			4
130	1,052			2
140	1,056			5
150	1,06			16
160	1,064			5
170	1,068		▼	11
180	1,072		0	3
190	1,076	▼	22	8
200	1,08	0	23	0
210	1,084	20	0	▲
220	1,088	22	▲	
230	1,092			

Показано (рис. 5), что икра горбуши набухает и в растворах сахарозы, однако несколько слабее, чем в пресной воде.

Ооциты, набухающая икра и «горох» горбуши проницаемы для NaCl, а при ее концентрации, равной 110‰, «горох» всплывает к поверхности раствора и нормальные ооциты могут быть отделены от аномальных. В слабых растворах поваренной соли икра не только не набухает, но и оболочка икринок не затвердевает. В свою очередь, если в пресной воде и растворах сахарозы плотность икры после набухания резко снижается, то в растворах соли она увеличивается.

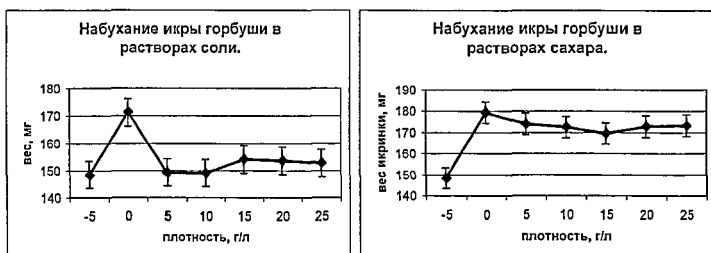


Рисунок 5 - Набухание икры горбуши в растворах NaCl и сахарозы разной плотности

Полученные данные указывают на невозможность применения растворов соли, как с низкими, так и тем более - с высокими ее концентрациями, для отделения ооцитов от «гороха» с целью закладки икры на инкубацию, поскольку NaCl не только препятствует проникновению воды в ооциты и затвердению их оболочек, но сама легко проникает в ооциты.

Однако раствор NaCl, непригодный для отделения нормальных ооцитов от «гороха» с целью их дальнейшей инкубации, может быть применен при приготовлении пищевой икры как для удаления «гороха» перед солением и консервацией икры, так и в качестве промывочного раствора с целью повышения качества конечной продукции.

В условиях воспроизводства для отделения «гороха» предпочтительнее использовать раствор сахарозы. Сравнение (рис. 6) особенностей изменения массы нормальной икры и «гороха» в оптимальном для их разделения растворе сахара (200 г/л) с изменением массы икрой в процессе набухания в пресной воде показало, что масса нормальных ооцитов увеличивается с момента помещения их в раствор сахарозы, а «гороха» в этом растворе - неуклонно снижается. Более того, в растворе сахарозы набухание нормальной икры не только замедляется по сравнению с пресной водой, но через 3 ч сменяется на обратный процесс, то есть начинается уменьшение массы икринок. Эти данные указывают на то, что если осмотически активный раствор сахара приводит к обезвоживанию «гороха», то его воздействие на развивающуюся икру состоит из двух, одновременно действующих, составляющих, а именно: поглощения

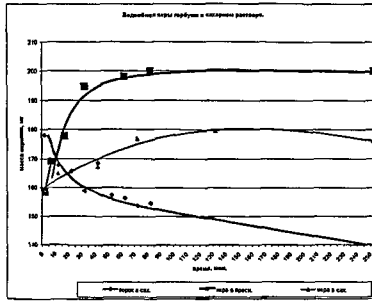


Рисунок 6 – Динамика водообмена икры и «гороха» горбуши в растворе сахарозы концентрацией 200 г/л

воды из раствора сахарозы, в соответствии с кортикальной реакцией, как это происходит с икрой в пресной воде, и ее обезвоживания за счет осмотичности сахарного раствора, как это происходит с «горохом». Кроме этого, для разделения икры разного типа важным фактором является время ее выдерживания в данном растворе.

Кратковременное воздействие (5 мин) раствора сахарозы в концентрациях 100 г/л и 200 г/л на набухание икры горбуши показало, что, хотя раствор сахарозы и замедляет процесс набухания во время нахождения в этом растворе и тем сильнее, чем концентрированнее раствор, тем не менее, после пересадки икры в пресную воду дальнейшее набухание происходит в ускоренном темпе. При этом чем концентрированнее был раствор сахарозы, тем интенсивнее после него набухает икра, приближаясь по массе к икре, набухающей в пресной воде. Таким образом, кратковременное воздействие на нормальную икру высоких концентраций сахарозы не оказывает негативного воздействия на процесс ее набухания после перемещения в пресную воду.

С целью изучения жизнестойкости нормальной оплодотворенной икры лососей после отделения ее от аномальных ооцитов типа «горох» с помощью раствора сахарозы исследовали влияние этого раствора на выживаемость. Для этого оплодотворенную икру поместили в раствор сахарозы с концентрацией 200 г/л на 3 мин. Затем с поверхности раствора удален «горох», а икра промыта водой, поставлена на набухание на 1 ч, после чего размещена на верхней рамке

инкубационного аппарата «VECO». Часть икры, не помещавшуюся в раствор сахарозы, разместили в том же аппарате, но на рамку ниже в качестве контроля. Через 3 сут выживаемость в опытном и контрольном вариантах оказалась сходной и высокой: в контроле одна погибшая икринка, в опыте – ни одной. Таким образом, процесс отделения «гороха» от нормально развивающейся икры кеты с помощью раствора сахарозы концентрацией 200 г/л в течение 3 мин не оказывает отрицательного влияния на жизнестойкость развивающейся икры по крайней мере в течение нескольких дней. При этом у подопытных, т.е. прошедших через раствор сахарозы, икринок несколько увеличивается перивителлиновое пространство, что улучшает потребление кислорода в процессе дальнейшего развития, а также снижает травматизм зародышей.

Глава 6. Обсуждение результатов

Увеличение количества самок тихоокеанских лососей с аномальной икры ("горох") породило при их разведении несколько неизвестных ранее проблем: биотехническую, технологическую и нормативно-правовую. Это вызывает необходимость: выбраковки значительной части овулировавшей икры; отделения аномальной икры лососей от нормальной при приготовлении пищевой продукции; увеличения нормативов резерва самок, необходимых для обеспечения искусственного воспроизводства. На основании проведенных исследований для решения первых двух задач в работе разработаны два разных метода. Анализ результатов показывает, что норматив резерва самок сахалинской кеты, в среднем может быть увеличен на 20% и составлять 30%.

Выводы

1. Средняя масса аномальных ооцитов типа «горох» у кеты на 57% больше, чем у нормальных, а у горбуши – на 30%. Их плотность у обоих видов меньше, чем у ооцитов нормального строения.
2. Образование и развитие «гороха» происходит в три этапа. На первом в ооците исчезают кортикальные гранулы, обводняется желток с увеличением массы, прозрачности и тургора без затвердения яичевой оболочки. Слой фолликулярных клеток сохраняется. На втором - жировые капли

укрупняются и концентрируются в верхней части желтка, остатки желтка располагаются под жировыми каплями в виде ватообразной массы; прозрачность «гороха» увеличивается. На третьем этапе происходит его резорбция остатков ооцита.

3. Аномальные ооциты типа «горох» не способны к развитию и именно они определяют процент гибели икры в первые сутки эмбриогенеза.
4. У кеты и горбуши аномальные икринки типа «горох» могут располагаться в передней, средней, каудальной частях гонады, различаются по количеству, а также размерам на мелкий и крупный «горох».
5. На разных реках о. Сахалин количество самок с аномальной икрой типа «горох» увеличивается от начала (2-40%) к концу нерестовой миграции (22-66%). Одновременно с этим увеличивается и количество «гороха» на одну самку. При этом, существуют реки как с высокой долей самок лососей с «горохом» вплоть до 100%, так и с его полным отсутствием.
6. Возникновению в яичниках кеты и горбуши аномальных ооцитов типа «горох» способствуют следующие факторы: перезревание самок к концу нерестового хода, повышенная плотность рыб при выдерживании в садках, увеличение в воде рек после дождей провоцирующих веществ.
7. При эндогенном или экзогенном воздействии на нормальные ооциты самок тихоокеанских лососей ионов железа и меди в их яичниках возникают аномальные ооциты типа «горох», причем чем выше концентрация ионов этих металлов, тем крупнее «горох».
8. Перезревание самок в конце нерестового хода приводит к образованию 100%-ного мелкого «гороха» и увеличению количества овариальной жидкости.
9. При недостатке кислорода в результате высокой плотности самок в садках или тромбоза сосудов яичника возникает мелкий «горох». Место расположения в яичнике «гороха» определяется степенью кровоснабжения в разных участках гонады.
10. Различия в плотности «гороха» и нормальных ооцитов позволили отделить

их друг от друга в растворах вещества с промежуточной плотностью, а именно в растворе сахарозы, для ее инкубации.

Практические рекомендации

1. Во избежание перезревания самок не допускать задержек их миграции к местам нереста или получения от них икры как в предустьевых участках моря, так и в процессе речного хода.
2. Для предупреждения возникновения в яичниках самок аномальных ооцитов типа «горох» не создавать сверхплотных скоплений рыб в садках при выдерживании, особенно в маловодные годы с низким содержанием кислорода в воде.
3. Аномальные ооциты типа «горох» можно отделить от нормальных, используя метод флотации икры в растворе сахарозы концентрацией 200 г/л в течение 1-2 мин. Всплывшую аномальную икру удаляют, а оставшуюся на дне нормальную помещают на промывание, набухание и инкубацию.
4. При производстве пищевой икры дальневосточных лососей «горох» и нормальную икру можно разделить, выдержав всю овулировавшую икру в течение нескольких минут в растворе NaCl концентрацией 90-120%. Всплывшую аномальную икру следует удалить, а оставшуюся нормальную – использовать для консервирования. Для искусственного воспроизводства этот способ неприемлем.
5. В связи с тем, что доля самок лососей с аномальными ооцитами типа «горох» на разных заводах о. Сахалин различается и варьирует у кеты в пределах 0-66%, требуется разработка биологических обоснований для увеличения норматив резерва самок для каждого вида и завода.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Микулина Ю.А. Роль анестетиков как диабетогенного фактора у рыб // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных. Мат-лы междунар. науч. конф. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2005. - С. 152-154 (соавторы: Микулин А.Е., Коуржил Я., Микулина Ю.А., Микодина Е.В.).

2. Микулина Ю.А. Роль кормления в смолтификации молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных. Мат-лы междунар. науч. конф. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2005. - С. 158-160 (соавторы: Микулин А.Е., Любаев В.Я.).
3. Микулина Ю.А. Исследование особенностей аномальных икринок типа «горох» из яичников самок горбуши и кеты в базовых реках ЛРЗ Сахалина // Аналитическая и реферативная информация ВНИЭРХ. Рыб. хоз-во. Сер. Прибрежное рыболовство и аквакультура, 2006. - Вып. 4. - С. 2-12 (соавтор Микулин А.Е.).
4. Микулина Ю.А. Изучение роли ионов металлов с различной валентностью *in vitro* и перезревания самок тихоокеанских лососей *in vivo* появлении аномальных ооцитов типа «горох» в яичниках // Аналитическая и реферативная информация ВНИЭРХ. Рыб. хоз-во. Сер. Прибрежное рыболовство и аквакультура, 2006. - Вып. 4. - С. 12-20.
5. Микулина Ю.А. Методы отделения аномальных ооцитов типа «горох» кеты и горбуши от нормальных // Объединенный научный журнал, 2006. - № 21 (181). - С. 66-69.
6. Микулина Ю.А. К обоснованию изменения нормативов резерва производителей тихоокеанских лососей // Мат-лы 1-й междунар. науч.-практ. конф. «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов» (Москва, 1-2 ноября 2006), 2006. - С. 124-126. (соавторы Микодина Е.В., Микулин А.Е., Любаева Т.Н., Любаев В.Я.).
7. Микулина Ю.А. Аномальная икра у тихоокеанских лососей на рыбоводных заводах о. Сахалин: биотехнические, технологические и нормативные проблемы // Рыбное хозяйство, 2007. - № 1. - С. 61-63. (соавторы Микодина Е.В., Микулин А.Е.).



Подп. в печать 12.04.07 Объём 1,5 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 47

ВНИРО. 107140, Москва, В. Красносельская, 17