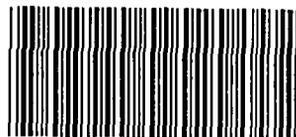


На правах рукописи

УДК 597.553.2:597-114.78



4854452

ПАВЛОВ
Ефим Дмитриевич

**Состояние половых желёз лососевых рыб в условиях
интродукции**

Специальность 03.02.06 – ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

17 ФЕВ 2011

Москва - 2011 г.

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте
рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП «ВНИРО»).

Научный руководитель: профессор, доктор биологических наук
Микодина Екатерина Викторовна

Официальные
оппоненты: доктор биологических наук
Чмилевский Дмитрий Алексеевич

кандидат биологических наук
Метальникова Ксения Владимировна

Ведущая организация: Биологический факультет Московского
государственного университета им. М.В.
Ломоносова (МГУ)

Защита состоится 25 февраля 2011 г. в 11 часов 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 25 января 2011 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



М.А. Седова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Лососевые являются одной из наиболее изученных групп рыб из-за их высокой гастрономической ценности, промыслового значения, быстрого темпа роста, широко применяемого и повсеместно распространённого искусственного разведения и товарного выращивания. Наряду с хозяйственной ценностью и высокой рыночной стоимостью, особенности онтогенеза лососевых являются основой для использования их в качестве объектов культивирования.

Многие из имеющихся научных публикаций позволяют оценить возможности разведения лососей в новых регионах, расположенных вне ареала на границах зон толерантности для конкретного вида. Однако, большинство таких работ, например, по радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, основаны на относительно краткосрочных экспериментах продолжительностью 96–168 ч (Currie et al., 1998), либо проведены в камеральных условиях, не отражающих в полной мере естественные климатические условия (Pornsoping et al., 2007). Поэтому, как правило, не удаётся проследить долгосрочные последствия вселения или разведения рыб, такие, как изменения темпа роста, либо функционирования воспроизводительной системы. Некоторые факторы среды (фотопериод, условия выращивания на рыбоводном хозяйстве) не учитываются при проведении экспериментов, но оказывают своё специфичное, не всегда предсказуемое действие на организм объекта аквакультуры. Основываясь на результатах продолжительных экспериментальных работ в этом направлении, рыб, адаптированных для выращивания в несвойственных для них условиях окружающей среды, можно успешно культивировать, в том числе при широком диапазоне температуры воды и воздуха (Molony, 2001).

При культивировании или акклиматизации любого объекта в новых природных зонах одной из первостепенных задач является оценка возможности его успешного размножения (Сакун, 1965; Стороженко, Тютюнник, 1973), так как функционирование воспроизводительной системы рыб тесно взаимосвязано с условиями окружающей среды и отражает адаптивную способность вида к

новым условиям обитания или культивирования. Изучение размножения приобретает особое значение, так как в течение раннего онтогенеза рыб происходят важнейшие события, в том числе дифференцировка пола, формирование фонда половых клеток и становление будущей плодовитости (Персов, 1975). Изучение протекания гаметогенеза рыб в новых условиях позволяет уже на ранних этапах оценить состояние их воспроизводительной системы, выявить нарушения в формировании их гонад и разработать методы, снижающие отрицательную нагрузку на организм того или иного фактора.

В свете изложенного, представляется актуальным морфофункциональное исследование воспроизводительной системы у лососевых рыб в специфических условиях их обитания или культивирования.

Целью настоящей работы является оценка состояния воспроизводительной системы лососевых рыб (радужной форели и жилой формы нерки – кокани *O. nerka*) в специфических условиях их интродукции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать условия обитания радужной форели в южном Вьетнаме и жилой нерки – кокани, в Камчатском крае.
- 2) Изучить динамику состояния половых желёз радужной форели южного Вьетнама, в том числе у рыб, подвергнутых инверсии пола.
- 3) Изучить состояние гонад кокани, интродуцированной в озёра Камчатского края.
- 4) Изучить биохимические и морфологические показатели крови радужной форели.

Научная новизна. Впервые проведена оценка состояния половых желёз у радужной форели, выращиваемой в тропическом климате южного Вьетнама, на разных этапах жизненного цикла, установлены критические факторы окружающей среды, а также особенности технологии выращивания, влияющие на гаметогенез рыб в данных условиях. Впервые показано, что искусственное гормональное воздействие андрогенами при определённых условиях снижает долю и типы нарушений в процессе сперматогенеза радужной форели. Впервые

изучен гормональный статус форели при её культивировании в условиях южного Вьетнама. Впервые описано состояние гонад кокани более чем через 20 лет после её интродукции в Толмачёвское водохранилище и в оз. Демидовское.

Практическое значение. Подготовлены материалы к разработке нормативов по выращиванию радужной форели в условиях южного Вьетнама. Показано, что для обеспечения полноценного воспроизводства радужной форели в условиях южного Вьетнама необходимо кардинально видоизменить используемую технологию культивирования. Для организации ежегодного промышленного лова кокани в Толмачёвском водохранилище рекомендовано проводить регуляцию её численности с помощью промысла.

Апробация работы. Основные результаты исследований представлены на "Чтениях памяти В.Я. Леванидова" (Владивосток, 2008), Международной конференции "Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб" (Санкт-Петербург, 2010), III Международной конференции с элементами школы для молодых учёных, аспирантов и студентов (Петрозаводск, 2010), Всероссийской молодёжной конференции "Вклад молодых учёных и специалистов в рыбохозяйственную науку России" (Санкт-Петербург, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, две из них в издании, рекомендованном ВАК РФ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У лососевых рыб, часть жизненного цикла которых проходит в нестандартных условиях со смещением некоторых абиотических показателей к границам толерантных зон, развитие и морфофункциональное состояние репродуктивной системы отклоняется от нормы.

2. Цитологические нарушения в гонадах радужной форели и кокани сходны с возникающими у других видов рыб при воздействии различных неблагоприятных факторов, что свидетельствует о неспецифической реакции.

3. Кратковременное (2.5–3.0 мес) искусственное гормональное воздействие на форель синтетическим метилтестостероном (МТ) стабилизирует формирование и интенсифицирует развитие её гонад.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 349 источников, из которых 215 на иностранных языках. Работа изложена на 180 страницах текста, содержит 37 рисунков и 12 таблиц.

Благодарности. Автор приносит глубокую благодарность академику Д.С. Павлову (ИПЭЭ РАН), д.б.н. В.П. Васильеву (ИПЭЭ РАН), д.б.н. Н.В. Кловач (ВНИРО), Нгуен Ти Хуан Ту (НИИ Аквакультуры №3, Республика Вьетнам) за предоставленную возможность сбора материала; к.б.н. Н.Г. Емельяновой, к.б.н. Г.Н. Маркевичу (МГУ им. М.В. Ломоносова) и д.ф.-м.н. В.М. Ольшанскому (ИПЭЭ РАН) за советы и помощь в поле; Ганжа Е.В. (ВНИРО) и Во Тхи Ха (Российско-Вьетнамский Тропический Центр) за участие в совместной экспедиции. Искренне благодарю моего научного руководителя профессора, д.б.н. Е.В. Микодину за всестороннюю помощь и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

На основании сведений из литературных источников описаны различные стороны биологии объектов исследования. Рассмотрено влияние абиотических и антропогенных факторов среды на рыб, в частности на формирование и развитие их воспроизводительной системы; особое внимание уделено лососевым видам. Приведены данные по количеству гонадотропных и половых стероидных гормонов в крови рыб на разных стадиях их жизненного цикла. Описаны методы и результаты искусственного воздействия на рыб с целью получения однополых или триплоидных особей.

Глава 2. Материал, условия обитания и методики

Объекты исследования – радужная форель, интродуцированная в южный Вьетнам для целей аквакультуры, и жилая форма нерки – кокани, вселённая в оз. Толмачёвское и Демидовское (Камчатский п-ов) для создания биоресурсов.

Материал по радужной форели собран в апреле–мае 2009 г. и в апреле–июне 2010 г. на экспериментальном рыбоводном заводе "Клонг-Кланх" (Klong-Klanch) научно-исследовательского института аквакультуры № 3 (RIA 3). Оно

расположено в 50 км на северо-восток от г. Далат на высокогорном плато (1485 м над уровнем моря), разделено руслом реки на 2 участка, с каскадным водоснабжением из горных рек. В 2009 г. изучали сеголеток, выращенных из икры, импортированной в 2008 г. из США (компания "Troutlodge") и двухлеток радужной форели – из икры, завезённой в 2007 г. из Финляндии. Из всей импортированной икры должно было вырасти однополое женское стадо.

Таблица 1. Характеристика материала исследованной радужной форели

Показатели	Число рыб, экз.				
	2009 г.		2010 г.		
	0+	1+	0+	1+	2+
Биологический анализ	75	10	18	60	12
Гистологический анализ	75	10	38	223	–
Содержание глюкозы	–	10	18	174	12
Содержание гормонов	–	10	–	53	12
Цитометрический анализ*	–	–	18 (6)	34 (7)	12 (6)

* Перед скобками – измерение ядер эритроцитов (4435 измерений), в скобках – измерение площади эритроцитов и расчёт ядерно-плазменного отношения (351 измерение).

В 2009 г. исследовали двухлеток радужной форели финского и подопытных сеголеток американского происхождения: вариант I (обработка МТ в течение 3 мес), вариант II (воздействие МТ – 2.5 мес) и контроль (МТ не влияли). В 2010 г. изучали радужную форель: в возрасте 1+ (икра США) и 2+ (финская икра). Кроме этого, в 2010 г. также изучено потомство самок финского происхождения и самцов из северного Вьетнама (сеголетки в возрасте 5 мес). Всего проанализировали 358 особей форели (табл. 1).

Таблица 2. Характеристика материала исследованной кокани

Показатели	Число рыб				
	Толмачёвское водохранилище			оз. Демидовское	
	2004 г.	2006 г.		2007–2009 гг.	
	самки	самки	самцы	самки	самцы
Биологический анализ	73	91	102	12	6
Плодовитость	73	31	–	–	–
Возраст	73	193		–	
Диаметр ооцитов	–	91	–	12	–
Гистологические срезы гонад	–	85	41	12	6

В Толмачёвском водохранилище материал собран в июле–сентябре 2004 и 2006 г., а в оз. Демидовском – в 2007–2009 гг. Толмачёвское водохранилище расположено в южной части Камчатского п-ова (52°36'29.00"с.ш.,

157°39'05.00"в.д.) на вулканическом нагорье высотой 640 м н/у моря; оз. Демидовское – небольшой бессточный водоём, находится в центральной части этого же п-ова (53°57'08.00"с.ш., 158°03'10.00"в.д.) на 150 км севернее Толмачёвского водохранилища. Проанализировано 284 экз. кокани (табл. 2).

На форелевом хозяйстве Клонг-Кланх в 2010 г. в течение двух месяцев измеряли температуру воды (термодатчики iButton DS-19229), содержание в ней кислорода (оксиметр Hanna HI 9147) и pH (Hanna pHer HI 98128).

Биологический анализ и подсчёт плодовитости проводили по Правдину (1966). Данные по возрасту кокани любезно предоставлены Г.Н. Маркевичем (2008). У радужной форели определяли коэффициент упитанности (КУ) по Кларк. Стадии зрелости гонад и периодизация оогенеза приведены по Мурза, Христофорову (1991) и Чмилевскому (2003). Гистологический анализ проведён по модифицированным методикам (Микодина и др., 2009). Фотографии срезов гонад сделаны с помощью РС с видеокамерой Leica при окуляре 10× и объективов 5, 10, 20, 40, 100×. Изображения обрабатывали в Photoshop CS3. Измерение ооцитов и эритроцитов проводили с помощью программы Image J v. 1.33, ядерно-плазменное (яд./пл.) соотношение вычисляли по площадям.

У форели определяли содержание глюкозы в плазме (Biochem SA (НТИ, США)) или в цельной крови (Ascensia Entrust (Bayer)). Для определения ФСГ, ЛГ¹ и половых стероидных гормонов кровь прижизненно отбирали из хвостовой вены, помещали в пробирки с ЭДТА объёмом 2.5 мл и центрифугировали при 3000 об/мин. Гормоны определяли твердофазным иммуноферментным методом – иммунопланшетным фотометром Immunochem-2100, микропланшетными инкубатором-шейкером Immunochem-2200 и автоматической мойкой Immunochem-2600. Мазки крови форели окрашивали азур-эозином по Романовскому, изучали под микроскопом Leica, по размеру эритроцитов, их ядер и яд./пл. соотношению судили о плоидности (Васильев и

¹ Два гонадотропных гормона рыб – ГТГ-I и ГТГ-II (Бурлаков, 1978, 1997, 2002; Yaron et al., 2003) функционально соответствуют фолликулостимулирующему (ФСГ) и лютеинизирующему (ЛГ) гормонам человека (Quecrat et al., 2000; Swanson et al., 2003).

др., 2005; Лебедева, 2007; Wlasow et al., 2004; Dorota et al., 2006).

Статистическая обработка материала выполнена с использованием MS Excel 2003. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Глава 3. Гонадо- и гаметогенез радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях аквакультуры южного Вьетнама

3.1. Гидрохимия форелевого хозяйства Клонг-Кланх

С апреля по июнь 2010 г. средняя температура воды на водозаборе составляла 18.0 (16.5–20.2) °С, а в последнем бассейне каскада – 20.8 (17.5–26.7) °С (рис. 1). На водозаборе температура воды приемлема для выращивания форели, но в конце каскада она слишком высокая для размножения (Зеленников, 1999; Pankhurst et al., 1996; Pornsoping et al., 2007). Верхние температурные пределы воды в бассейнах хозяйства Клонг-Кланх считаются критическими даже для выживания данного вида (Rodgers, Griffiths, 1983).

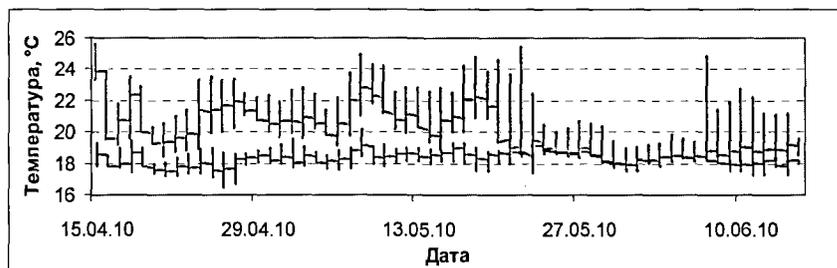


Рис. 1. Динамика и диапазон изменения температуры воды на рыбноводном хозяйстве Клонг-Кланх с 15.04 по 13.06.2010 гг. на водозаборе (красный) и в последнем бассейне каскада (синий).

Среднее содержание кислорода в начале мая утром на участке №1 составляло 7.1 мг/л, днем – 8.5 мг/л, а на участке №2 – 6.6 и 7.0 мг/л соответственно, т.е. концентрация кислорода в воде в течение дня возрастала. Самый низкий уровень кислорода составлял 5.4 мг/л, что можно считать границей толерантности для выживания форели. Установка 14 мая аэратора воды в средний бассейн каскада участка №2 позволила нормализовать концентрацию кислорода в бассейнах до 9.5 и 9.1 мг/л.

Средний рН в бассейнах хозяйства Клонг-Кланх составлял 7.31 и варьировал в узких пределах, соответствующая норме.

3.2. Биологические показатели и анатомические нарушения у сеголеток, двухлеток и трёхлеток радужной форели

Средняя длина сеголеток форели (икра США) в возрасте 5 мес составляла 10.2 ± 0.17 (7.0–11.6) см, масса – 15.0 ± 0.71 (4.8–22.7) г, а КУ – 1.1 ± 0.02 (0.8–1.4). Различия между экспериментальными группами недостоверны ($p > 0.05$). Длина сеголеток того же возраста вьетнамской генерации составляла 11.8 ± 0.22 (9.8–13.3) см, масса – 17.1 ± 0.69 (10.0–21.7) г, а КУ – 0.9 ± 0.03 (0.6–1.1). Они были достоверно ($p < 0.001$) крупнее, чем сеголетки контрольной группы из американской партии икры. Двухлетки финского происхождения, были крупнее, чем американского: длина – 39.5 (36.7–42.5) см, масса – 841 (610–990) г, масса гонад – 3.6 (2.0–6.6) г, а КУ – 1.2 (1.1–1.4). Длина двухлеток (икра США) составляла 34.7 ± 0.47 (26.2–39.2) см, масса – 441 ± 20.5 (167–719) г, масса крупных (> 0.5 г) гонад – 1.6 (0.5–4.9) г, а КУ – 0.9 ± 0.01 (0.8–1.1). Длина и масса у форели в варианте II достоверно больше, чем у рыб в варианте I и контроле ($p < 0.001$). Длина производителей радужной форели (возраст 2+) достигла 49.4 (46.0–53.4) см, масса – 1521 (1200–1870) г, а КУ – 1.1 (1.0–1.2). Средняя масса их гонад составляла 117.7 г и варьировала в широких пределах (10.8–208 г), что обусловлено тем, что часть рыб частично, реже полностью выметала икру.

У всех сеголеток и двухлеток обнаружено значительное ожирение полости тела и внутренних органов, а у некоторых особей – аномалии строения тела (асимметричное расположение плавников, полиморфные костные образования под кожей, отсутствие одного или двух глаз). Около 30% производителей радужной форели частично или полностью были слепыми.

3.3. Цитология гонад у радужной форели финского происхождения

Двухлетки. Все изученные рыбы – самки. У 20% из них выявлена деформация гонад (рис. 2а), что, как правило, обусловлено влиянием неблагоприятных факторов внешней среды (Захарова, Чмилевский, 1985; Белова и др., 1993; Микодина, 2002; Pomsoring et al., 2007). У радужной

форели, выращиваемой в условиях южного Вьетнама, деформацию гонад, вероятно, может вызывать интенсивное ожирение полости тела. Несвоевременный перевод личинок лососей на экзогенное питание также может негативно повлиять на анатомию их половых желёз (Седова и др., 2008).

В яичниках двухлеток радужной форели выявлена размерная и цитологическая разнокачественность, проявляющаяся в разной степени развития клеток текущей генерации. Половые клетки текущего фонда представлены ооцитами периода вителлогенеза, что характерно для яичников III ранней стадии зрелости. В гонадах некоторых рыб отмечена интенсивная васкуляризация стромы. На многих срезах имеются вителлогенные ооциты с извилистой мембраной и резорбирующиеся клетки (рис. 2б). Нарушение структуры оболочки ооцита отражает процесс резорбции клетки при формировании конечной плодовитости. Цитоплазма некоторых разрушающихся превителлогенных ооцитов имеет тёмные включения. Вероятно, это конечный продукт распада каротиноидов – липофусцин (Татарюнас, 1999; Tatarianus, 1998). В некоторых ооцитах идёт разрушение ядерного материала – кариопикноз.

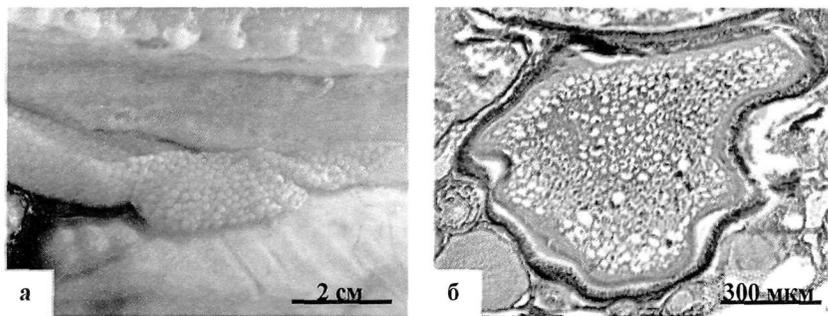


Рис. 2. Аномалии яичников III ранней стадии зрелости у двухлеток радужной форели: а – деформация гонады; б – резорбирующийся крупный ооцит и остатки разрушенных мелких.

Трёхлетки (производители). Только у 8% изученных производителей к июню 2010 г. до конца выметана вся икра, у остальных особей овулировала только её незначительная часть, многие ооциты перезрели и остались в полости тела. У 33% производителей обнаружены яичники III ранней стадии зрелости с

ооцитами следующей генерации. Это свидетельствует о десинхронизации созревания икры в условиях южного Вьетнама, на что, вероятно, оказали влияние специфичный для вида фотопериод, недостаток кислорода в бассейнах и высокая температура воды.

3.4. Цитология гонад у сеголеток радужной форели вьетнамской генерации

Гонады сеголеток представлены только семенниками I стадии зрелости, однако имеют характерную для яичников форму (Персов, 1975; Мурза, Христофоров, 1991; Макеева, 1992) с расширением краниальной части. Гистологически в гонадах выявлены только сперматогонии (светлые и немногочисленные тёмные типа А), цисты ещё не образованы. Эти аномалии могут отражать предыдущие геномные манипуляции с производителями.

Все гонады у изученных рыб имеют анатомические нарушения, выражающиеся в утолщении их оболочки и наличии поперечных перетяжек, возникающих на месте деструкции половых клеток (Микодина, 2002). В толще некоторых семенников встречаются не характерные для данного периода гаметогенеза остатки цитоплазматического материала, по-видимому, от разрушенных ооцитов. В генеративной ткани расположены не типичные для неё почечные каналцы, что, вероятно, отражает нарушения в формировании и конечной локализации презумптивных зачатков этих органов.

3.5. Цитология гонад у радужной форели американского происхождения

Сеголетки – контроль. Яичники находятся на II стадии зрелости, яйценозные пластинки сформированы. Половые клетки представлены оогониями и единичными ооцитами начальных ступеней периода превителлогенеза. Естественная для протогинических гермафродитов передифференцировка пола у этих особей в данном возрасте ещё не произошла.

Сеголетки – опыт. Морфология гонад у рыб, подвергнутых инверсии пола, визуально не различается у особей из обоих вариантов опыта, но их размеры несколько больше, чем у контрольных рыб. Среди подопытной форели имеются: 1) самки, 2) гермафродиты, в гонадах которых одновременно имеются оогонии, ооциты, сперматогонии и сперматоциты, а также 3) стерильные особи

(20% рыб). Через месяц после завершения эксперимента по инверсии пола, 15% особей из варианта I и 30% – из варианта II, цитологически являлись интерсексами. Во многих гонадах сеголеток в трёх группах отмечена нехарактерная для нормы гипертрофия кровеносных сосудов, свидетельствующая о деструкции тканей. Она наиболее выражена в гонадах подопытных рыб, но в меньшей степени встречается и у контрольных.

Двухлетки. Значительная часть гонад форели в возрасте 1+ малого размера (<0.5 г), представлена длинными непрозрачными тяжами, иногда имеющими небольшое расширение только в краниальной части. Яичники радужной форели финского происхождения практически того же возраста были значительно больше по размеру, что свидетельствует об аномальной задержке развития гонад у рыб, выращенных из икры США. Доля особей с крупными гонадами в контроле составляет 6%, в вариантах I и II – 20% и 40% соответственно. Крупные половые железы имеют форму, нехарактерную для гонад лососевых (Мурза, Христофоров, 1992). По визуальной оценке текстуры ткани половых желёз у радужной форели всех трёх групп гонады представлены семенниками, но их форма больше характерна для самок, чем самцов (рис. 3а). Правая и левая гонады часто различаются по размеру, а многие семенники на всём своем протяжении имеют ярко выраженные поперечные перетяжки.

У форели трёх изученных групп гонады в основном являются семенниками, содержащими половые клетки двух состояний – светлые активные сперматогонии типа А и более дифференцированные клетки – сперматоциты I порядка. Наличие в гонадах только сперматогоний типа А соответствует II стадии зрелости половых желёз. Гонады, одновременно содержащие сперматогонии и сперматоциты, либо только сперматоциты находятся на III ранней и III стадиях зрелости соответственно. В семенниках II и III стадий зрелости и у подопытных, и у контрольных рыб имеются морфологические и цитологические аномалии. Наиболее ярко (качественно и количественно) эти нарушения выражены в гонадах контрольной группы, но в той или иной степени отмечены и в гонадах подопытных рыб.

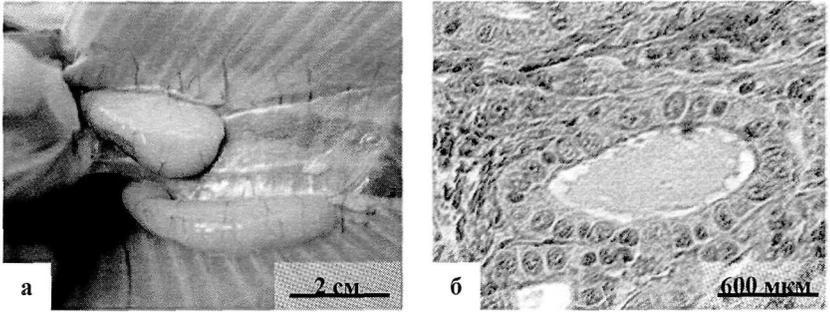


Рис. 3. Аномалии семенников двухлеток радужной форели (икра США). а – гонады III стадии зрелости нехарактерной морфологии; б – почечный каналец в гонаде II стадии зрелости.

II стадия зрелости. Во многих половых железах отмечена гипертрофия кровеносных сосудов, соединительной и жировой тканей. Вероятно, такое активное увеличение сосудистой сети в гонадах происходит на местах деструкции половых клеток. В гонадах с наиболее разросшейся соединительной тканью сперматогонии встречаются единично. Такие гонады мы относим к стерильным, так как маловероятно дальнейшее успешное их развитие. Формирование жировой ткани в гонадах происходит в местах деструкции генеративного материала, в некоторых половых железах жировая ткань может занимать значительную часть гонады, что свидетельствует о тотальной деструкции сперматогониев. Некоторые мелкие семенники частично или целиком пронизаны крупными овальными полостями, располагающимися между соединительной тканью и сперматогониями. Полости ограничены чётко очерченной мембраной, в некоторых располагается цитоплазматический материал. Его наличие в семенниках у сеголеток и двухлеток радужной форели, может свидетельствовать о прошедшей деструкции ооцитов, вероятно связанной с переопределением пола в сторону самцов. Известно, что для многих лососевых (Billard, 1992) свойственен протогинический гермафродитизм (Персов, 1975; Мурза, Христофоров, 1991; Седова, 1991; Макеева, 1992), выражающийся в переопределении части половых клеток в гонадах с женских на мужские. В норме у таких рыб при формировании

семенников все ооциты дегенерируют. Наличие в гонадах двухлеток форели остатков цитоплазмы может свидетельствовать о значительной задержке процесса переопределения пола.

В гонадах II стадии зрелости у 23 % рыб, кроме присущих им половых клеток, обнаружены почечные каналцы (рис. 3б), что нехарактерно для нормы (Алмазов, Сутулов, 1978; Калашникова, 2003; Кюнель, 2007). Почечная ткань ярко выражена в половых железах контрольной группы радужной форели, в гонадах подопытных рыб она встречается реже и в меньшем количестве. Вероятно, что в раннем онтогенезе у таких рыб не произошло окончательного отделения семенника от почечной ткани, вследствие чего они срослись, а их клеточные структуры совместно развивались в одной оболочке.

III стадия зрелости. В гонадах III стадии зрелости многие сперматогонии разрушаются, что выражается в гипертрофии кровеносных сосудов, соединительной и жировой ткани. Кровеносные сосуды активно участвуют в деструкции половых клеток. Часто от крупного кровеносного сосуда отходят мелкие ответвления, вдающиеся внутрь половой железы. Как и в половых железах II стадии зрелости, в гонадах III стадии выявлена локализация остатков цитоплазмы, что свидетельствует о том, что более интенсивное развитие половых клеток не влияет на её наличие в половых железах.

Гермафродиты. Гермафродитизм выявлен только у нескольких контрольных особей радужной форели (рис. 4). Половые железы таких рыб одновременно представлены светлыми сперматогониями типа А и ооцитами периода превителлогенеза, многие из которых подвержены деструкции.

Стерильные особи. Стерильные гонады имеют небольшой размер (<0.5 г) и в основном состоят из разросшейся соединительной и жировой тканей. Оболочка таких гонад за счёт гипертрофии тканей толстая и плотная. В некоторых стерильных гонадах между соединительной и жировой тканями лежат клетки крови, цитоплазматический материал и почечные каналцы. В контрольной группе (МТ не использовали) доля стерильных рыб наибольшая – 51% (рис. 4). Таким образом, бóльшая часть радужной форели в возрасте 1+

является самцами, самки не обнаружены, а часть рыб стерильна, в контрольной группе имеются гермафродиты (рис. 4). В варианте II наибольшее число рыб с гонадами, содержащими сперматозоиты, что свидетельствует о более интенсивном развитии половых желёз у особей этой группы.

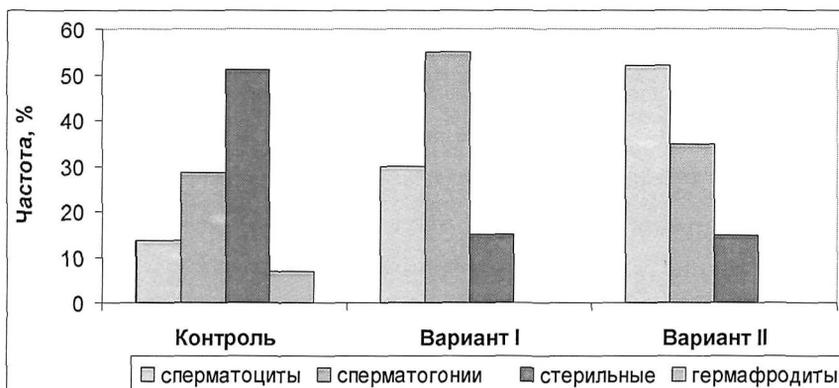


Рис 4. Распределение трёх групп радужной форели американского происхождения в возрасте 1+ в зависимости от клеточного состава её гонад.

Выявленная в нашей работе высокая доля стерильной форели не обусловлена действием МТ, что предполагает влияние другого фактора, подавляющего формирование гонад. Учитывая сходные черты формирования половых желёз триплоидных рыб (Gervai, 1980; Benfey, 1999; Solomon, 2002), мы предполагаем, что форель американского происхождения триплоидна.

Глава 4. Морфология и биохимия крови форели южного Вьетнама

Цитометрия эритроцитов радужной форели американского происхождения. Средний диаметр ядер эритроцитов у сеголеток составлял 5.6 ± 0.04 (4.0–9.0) мкм, у рыб в возрасте 1+ – 8.9 ± 0.04 (6.0–14.0) мкм, однако у особей в возрасте 2+ – 6.3 ± 0.02 (5.0–10.5) мкм, различалось достоверно ($p < 0.001$). Размеры ядер эритроцитов в крови двухлеток значительно (в 1.4 раза) крупнее, чем у трёхлеток что указывает на триплоидию этих рыб (Woznicki, Kuzminski, 2002). Увеличенные ядра эритроцитов у триплоидов обусловлены ббльшим содержанием генетического материала, чем у диплоидов. Площадь эритроцитов в крови производителей радужной форели

финского происхождения составляла 409 ± 5.6 (264–587) $\mu\text{км}^2$, её потомства – 384 ± 15.2 (151–656) $\mu\text{км}^2$, а у форели американского происхождения – 584 ± 10.1 (367–1121) $\mu\text{км}^2$, что в 1.42 раза больше, чем у производителей и в 1.52 раза больше, чем у их потомства. Известно, что площадь эритроцитов у триплоидных рыб примерно в 1.3–1.5 раза больше, чем у диплоидных (Васильев и др., 2005; Лебедева, 2007), что подтверждают полученные нами данные. Ядерно-плазменное отношение эритроцитов производителей радужной форели финского происхождения составляло 0.16 ± 0.004 (0.07–0.31), её потомства – 0.19 ± 0.004 (0.12–0.31), тогда как у форели американского происхождения (контрольная группа) – 0.21 ± 0.004 (0.12–0.42). Различия между изученными тремя группами рыб достоверны ($p < 0.001$). Высокую величину показателя у потомства вьетнамской генерации по сравнению с родительскими особями, мы связываем с различием в возрасте этих рыб, а у форели американского происхождения, этот показатель отражает увеличенное ядро в эритроцитах.

Эритроциты в крови радужной форели американского происхождения в возрасте 0+ и 1+ часто подвержены амитозу, в некоторых из них выявлена высокая доля сегментированных ("двойных") ядер, а у производителей такие нарушения встречались реже. Известно (Wlasow et al., 2004), что в крови триплоидных рыб доля таких аномалий достаточно высока, что также подтверждает наше предположение. Для точного определения плоидности радужной форели (икра США) необходим её кариологический анализ.

Глюкоза крови. В крови двухлеток радужной форели (финская икра), среднее содержание глюкозы в плазме составляло 6.9 ± 0.20 (4.8–10.8) ммоль/л. У сеголеток вьетнамской генерации концентрация глюкозы в цельной крови составляла 7.9 ± 0.45 ммоль/л (1.7–10.5), у двухлеток (икра США) – 7.6 ± 0.31 (2.0–18.1) ммоль/л, а у трёхлеток (финская икра) – 9.0 ± 0.44 (6.2–14.1) ммоль/л. Различия концентрации глюкозы у контрольных и подопытных двухлеток форели (икра США) недостоверны ($p > 0.05$). Т.е. проведённая гормональная инверсия пола не повлияла на её содержание.

У форели различного происхождения в аквакультуре южного Вьетнама в возрасте 0+, 1+ и 2+ среднее содержание глюкозы оказалось выше, чем в близких к естественным условиям (Coweys et al., 1977; Yildiz, 2006) и индивидуально варьировало в 2.5–8 раз. Высокая концентрация глюкозы, вероятно, связана с перекармливанием форели на рыбоводном хозяйстве Клонг-Кланх, с низким качеством корма, может указывать на нарушения обмена веществ в организме или являться индикатором стресса в связи с её культивированием в нестандартных условиях.

Половые гормоны у радужной форели финского происхождения. Не у всей форели (финская икра) в плазме крови выявлены ФСГ и ЛГ. ФСГ определён у 100% двухлеток (1+) и 50% производителей (2+), а ЛГ – у 50% двухлеток и 17% производителей. Среднее содержание ФСГ у форели 1+ составляло 15.72 ± 5.797 (1.15–43.77) мМЕ/мл, а у рыб в возрасте 2+ – 0.38 ± 0.189 (0.00–2.10) мМЕ/мл. Содержание ЛГ у двухлеток – 7.11 ± 4.542 (0.00–44.28) мМЕ/мл, а у трёхлеток – 0.04 ± 0.035 (0.00–0.42) мМЕ/мл.

Содержание эстрадиола в плазме крови двухлеток составляло 6.41 ± 0.265 пг/мл, варьировало в узких пределах (5.14–8.00 пг/мл). У производителей его концентрация возросла более чем в 100 раз, до значения 686.23 ± 386.980 пг/мл и варьировала в широком диапазоне – от 169.80 до 4901.64 пг/мл. Средняя концентрация тестостерона в крови двухлеток составляла 5.60 ± 0.089 нг/мл и варьировала в узких пределах (5.08–6.08 нг/мл). В плазме производителей его содержание в среднем увеличилось на порядок – 45.33 ± 17.244 нг/мл, различаясь у разных особей от 3.37 до 191.67 нг/мл.

Половые гормоны у двухлеток форели американского происхождения. Как и у форели финского происхождения, ФСГ и ЛГ выявлены только у части рыб. Наибольшее содержание гонадотропинов отмечено в варианте II, а в контроле и варианте I оно практически не различалось. Концентрация ЛГ в крови изученных рыб была на 2 порядка ниже, чем у финских, и составляла в контроле 0.03 ± 0.022 (0–0.15) мМЕ/мл. У рыб, подвергнутых воздействию МТ, этот показатель был также низок: в варианте I – 0.02 ± 0.018 (0–0.29) мМЕ/мл, в

варианте II – 0.07 ± 0.070 (0–0.07) мМЕ/мл. Содержание ФСГ в контрольной группе оказалось вдвое ниже, чем у финских рыб, и составляло 0.90 ± 0.316 (0–2.39) мМЕ/мл. Концентрация ФСГ в варианте I составляла 0.90 ± 0.371 (0–4.85) мМЕ/мл, в варианте II – 2.17 ± 1.997 (0–20.13) мМЕ/мл.

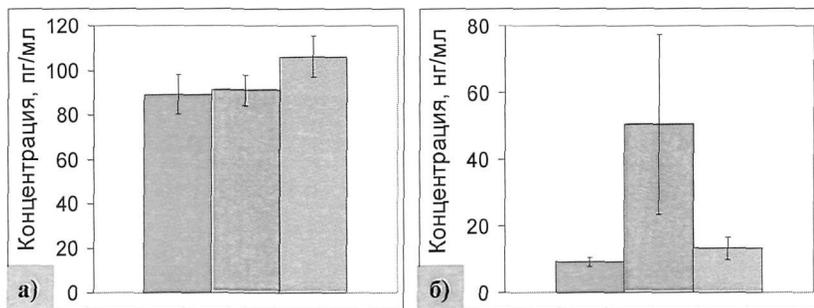


Рис. 5. Содержание эстрадиола (а) и тестостерона (б) в плазме крови двухлеток радужной форели (икра США) – контроль (оранжевый), вариант I (синий) и вариант II (зелёный).

Стероидные гормоны были выделены у всех изученных рыб. Содержание эстрадиола и тестостерона у двухлеток (рис. 5), полученных из икры США, значительно меньше (в 5 раз для тестостерона и в 15 раз для эстрадиола), чем у форели того же возраста, выращенной из икры, привезённой из Финляндии. Концентрация эстрадиола у двухлеток радужной форели различается незначительно (рис. 5а). Содержание тестостерона в плазме в контроле и варианте II практически не различается, а в варианте I – значительно выше (больше чем в 4 раза) чем в других двух группах (рис. 5б), что, по-видимому, связано с более длительным воздействием МТ (3 мес) на рыб. Вероятно, более продолжительное гормональное действие (вариант I) приводит к резкому увеличению количества тестостерона в организме, подавляя синтез гонадотропинов и снижая их содержание, а его менее продолжительное действие (вариант II) – не влияет на величину этих показателей.

Широкая вариабельность концентрации ФСГ и тестостерона в крови радужной форели из всех источников может также отражать специфические условия выращивания этих рыб. Вероятно, её можно рассматривать как

нарушение гормональной регуляции в организме радужной форели, выращиваемой за пределами зон её толерантности.

Глава 5. Гонадо- и гаметогенез кокани из водоёмов Камчатского п-ова

5.1. Кокани из Толмачёвского водохранилища

Биологические показатели. Одновозрастные (возраст 4+) производители кокани имеют чётко выраженный половой диморфизм: самцы достоверно ($p < 0.001$) крупнее самок. Так, длина самцов в 2006 г. составляла 160 ± 1.9 (108–210), масса – 49.5 ± 1.90 (12.3–102.2) г, а самок – 157 ± 2.0 (123–207) и 42.8 ± 2.00 (17.7–105.5) г соответственно. В 2006 г. длина и масса исследованных нами самок, а также их плодовитость оказались достоверно меньше ($p < 0.001$), чем в 2004 г. (табл. 3). Таким образом, у самок длина (АС) в 1.4 раза, масса – в 3.6 раза, масса яичников – в 2.5 раза оказались меньше, чем двумя годами ранее. Это может быть связано с увеличением численности рыб и возникшего вследствие этого дефицита кормовой базы (Маркевич, 2008, 2009).

Таблица 3. Биологические показатели и плодовитость самок кокани Толмачёвского водохранилища в возрасте 4+ в 2004 и 2006 гг.

Год	Длина (АС), мм	Масса рыб, г	Масса гонад, г	Абсолютная плодовитость, шт.	Относительная плодовитость, шт./г	Число рыб, экз.
2004	248.0 ± 2.00 190.0–329.0	222.3 ± 5.50 82.5–356.0	8.2 ± 0.60 3.5–10.2	238 ± 5.0 89–555	1.8 ± 0.10 0.7–3.5	73
2006	175.3 ± 2.90 153.0–210.0	61.5 ± 3.60 31.8–108.9	3.3 ± 0.10 0.6–8.1	172 ± 4.5 64–323	1.0 ± 0.10 0.4–1.9	31

Примечание. Над чертой – среднее значение показателя и его ошибка, под чертой – пределы варьирования показателя.

Самки. Масса яичников кокани на II стадии зрелости составляет около 0.01 г, на III – варьирует от 0.2 до 3.0 г, на IV – от 3.5 до 17.8 г.

II стадия зрелости. Яичники в основном представлены ооцитами периода цитоплазматического роста. Большая часть ооцитов (около 80–90%) в гонадах всех исследованных самок кокани имеет заметные отклонения в строении. Это выражается в изменениях строения ядра, цитоплазмы и фолликулярных клеток. В ряде случаев выявлена деструкция ядерной оболочки, впоследствии приводящая к смешиванию нуклео- и цитоплазмы.

Часто встречается обособление периферического слоя цитоплазмы, который может иметь меньшую плотность и ажурную структуру (рис. 6а).

III стадия зрелости. Половые клетки представлены преимущественно ооцитами периода вителлогенеза. Сегрегации цитоплазмы у вителлогенных ооцитов не наблюдается. Наиболее мелкие ооциты не содержат гранул желтка. Часто, наряду с вителлогенными ооцитами, присутствуют немногочисленные ооциты периода цитоплазматического роста (рис. 6б). Отличительной особенностью объекта наших исследований – нерки кокани, как и всех тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*, является моноцикличность, при которой, в отличие от полициклических видов рыб, развивается лишь одна генерация половых клеток. Для этих рыб характерно достаточно равномерное развитие всех имеющихся половых клеток текущей генерации и отсутствие резервного фонда (Персов, 1965, 1966, 1975; Макеева, 1992).

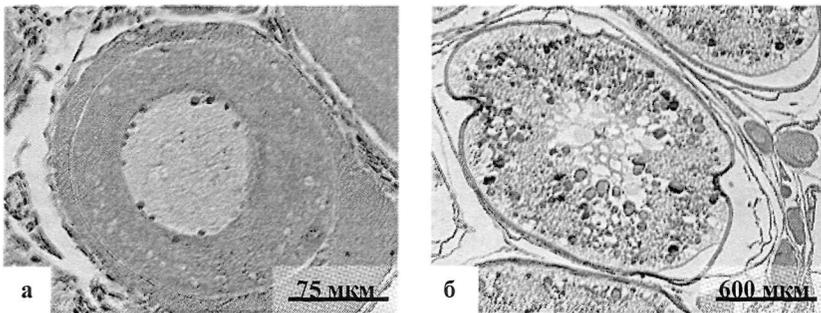


Рис. 6. Яичники кокани на II (а) и III (б) стадиях зрелости. а – anomальное отделение слоя периферической цитоплазмы в превителлогенных ооцитах; б – вителлогенные и превителлогенные ооциты.

Асинхронность развития ооцитов у кокани, вероятно, обусловлена несколькими причинами. Первая – Толмачёвское водохранилище принадлежит к числу холодноводных водоёмов с коротким сезоном вегетации (конец июля – середина сентября). Слишком низкая температура воды, нехарактерная для естественного ареала данного вида, могла оказать негативное влияние на развитие половых клеток. Вторая – дефицит и специфичность корма, при которых, как известно (Поляков, 1960; Алёшин, Чмилевский, 1987), стабильно

развивается только часть половых клеток. Третья – высокая плотность популяции в водохранилище (Маркевич, 2008, 2009), что, на наш взгляд, не исключает эту асинхронность. Подобное явление отмечено в ооцитах периода цитоплазматического роста у проходной нерки из поколений с высокой численностью (Городовская, 2008). Выявлены и другие нарушения в строении ооцитов толмачёвской кокани – хаотичное расположение вакуолей, вакуолеподобные структуры в гранулах желтка, свидетельствующие о том, что в яичниках этого вида резорбция ооцитов происходит как и у других рыб (Фалеева, 1965, 2008). У самок с гонадами III стадии зрелости anomальные ооциты встречаются реже, чем на II стадии.

IV стадия зрелости. Самки кокани с гонадами IV стадии встречаются единично, причём размеры правого и левого яичника часто заметно различаются. У самок с такими гонадами визуально видна размерная разнокачественность ооцитов, причём среди крупных клеток нормального строения, иногда видны мелкие побелевшие – атретические.

Самцы. На I стадии зрелости семенников половые клетки у всех особей представлены немногочисленными сперматогониями. На II стадии зрелости число сперматогониев возрастает, сформированы цисты и семенные каналцы. Половые клетки в семенниках III стадии зрелости представлены сперматоцитами I и II порядков. Во многих гонадах I–III стадий зрелости встречались разрушающиеся половые клетки, что выражалось в пикнозе их ядер и изменении тинкториальных свойств цитоплазмы. Между половыми клетками часто локализованы вакуолеподобные образования. В гонадах IV стадии зрелости изредка встречались гипертрофированные семенники.

Стерильные особи. Около 27% рыб по внешней морфологии половых желёз были отнесены к самцам, однако гистологически оказались стерильными. Строма таких гонад представлена соединительнотканными элементами и коллагеновыми волокнами, половые клетки не обнаружены.

5.2. Кокани из оз. Демидовское

Биологические показатели. Длина самок кокани из оз. Демидовское

составляла 151 (105–188) см, масса – 44 (13–81) г, а у самцов – 221 (202–239) см и 161 (101–191) г соответственно.

Самки. II стадия зрелости. Яичники представлены ооцитами периода цитоплазматического роста. В некоторых ооцитах видны участки более интенсивно окрашенной цитоплазмы, расположенной в околядерной зоне, возможно являющиеся скоплениями РНК или зоной деления митохондрий. По сравнению с ооцитами проходной нерки в яичниках II стадии зрелости (Городовская, 2002), в нуклеоплазме ооцитов кокани ядрышки разноразмерны и распределены неравномерно по периферии ядра. Как и у кокани из Толмачёвского водохранилища в некоторых ооцитах встречается обособление периферического слоя цитоплазмы, который может иметь меньшую плотность и ажурную структуру, его строение не соответствует циркумнуклеарному кольцу (рис. 7а). Не исключено, что подобное разделение цитоплазматического слоя в ооцитах периода превителлогенеза не является аномалией, а обусловлено спецификой гаметогенеза кокани. В некоторых половых клетках периода цитоплазматического роста отмечена деструкция ядерной оболочки, впоследствии приводящая к смешиванию нуклео- и цитоплазмы. В цитоплазме часто образуются тёмные округлые включения (рис. 7б). Многие резорбирующиеся ооциты имеют извилистые контуры.

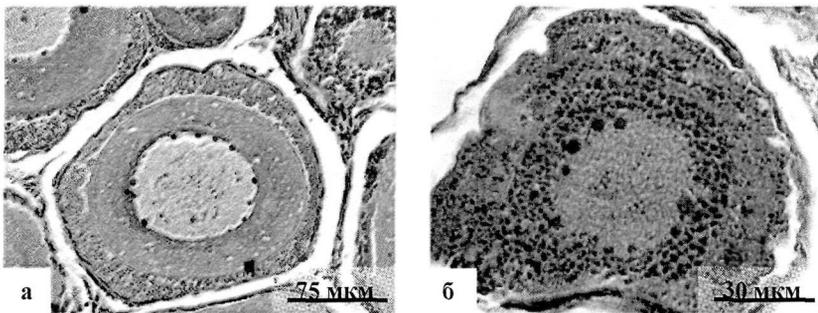


Рис. 7. Яичники кокани на II стадии зрелости. а – отделение слоя периферической цитоплазмы; б – деструкция ядерной оболочки, включения липофусцина в цитоплазме.

III стадия зрелости. В ооцитах начался вителлогенез, о чём свидетельствует их интенсивная вакуолизация, начинающаяся от центра. Ядро

таких ооцитов образует многочисленные выросты в цитоплазму, его мембрана становится извилистой. Цитоплазма не сегрегирована. Правый и левый яичники на этой стадии могут отличаться по размеру в несколько раз. Крупный яичник обычно представлен ооцитами периода начала вителлогенеза, а мелкий – превителлогенными ооцитами. Цитоплазма превителлогенных ооцитов сегрегирована, в ней хорошо заметны мелкие тёмноокрашенные округлые включения, отмеченные нами в превителлогенных ооцитах в гонадах радужной форели из хозяйства Клонг-Кланх. По морфологии такие образования сходны с включениями липофусцина (Татарюнас, 1999; Tatarunas, 1998). Не исключено, что образование липофусцина в ооците периода превителлогенеза свидетельствует о протекании деструкции генеративной ткани, сопровождающейся распадом каротиноидов. Выявленная локализация липофусцина в гонадах у кокани и радужной форели, возможно, свидетельствует о сходных нарушениях, проявляющихся в половых железах лососей при влиянии неблагоприятных факторов среды.

Самцы. Семенники I, II и III стадий зрелости у демидовской кокани в целом имеют сходные черты с таковыми у толмачёвской не только в норме, но и по типам аномалий. Например, между половыми клетками формируются нехарактерные полости, свидетельствующие об их деструкции.

Таким образом, обнаруженные нарушения в строении гонад радужной форели и кокани из двух популяций, в целом сходны с описанными ранее у других видов рыб, возникающими в ответ на воздействие неблагоприятных антропогенных факторов (Макеева и др., 1994; Савваитова и др., 1995; Павлов Д.С. и др., 1999; Чмилевский, 2000; Белова, 2002). По нашим данным, состояние половых желёз и гормональный статус у лососевых рыб тесно связаны с условиями их обитания и культивирования, а также с геномными манипуляциями в раннем онтогенезе.

ВЫВОДЫ

1. Абиотические факторы культивирования интродуцированной в тропические условия южного Вьетнама радужной форели – фотопериод,

температура воды и содержание в ней кислорода, находятся за пределами зон толерантности. Интродуцированная кокани обитает в ранее безрыбных водоёмах.

2. Условия среды, в которых обитают радужная форель и кокани, отрицательно влияют на развитие и строение их гонад, приводя к деструкции половых клеток, появлению стерильных особей, снижению конечной плодовитости.

3. Воздействие на радужную форель МТ на ранних этапах онтогенеза интенсифицирует её сперматогенез, стабилизирует формирование и развитие семенников, снижает долю цитологических аномалий. Эффект от действия экзогенного гормона наиболее ярко выражен при его использовании в течение 2,5 мес.

4. Высокая индивидуальная вариабельность содержания ФСГ и тестостерона в крови радужной форели одного возраста финского и американского происхождения свидетельствует о дисбалансе её гормональной регуляции, что приводит к десинхронизации и пролонгированию сроков нереста у диплоидных производителей.

5. Несколько критериев: достоверно увеличенный размер ядер эритроцитов, их сегментированность, высокая доля амитозов, достоверно большее ядерно-плазменное соотношение, аномалии в строении половых клеток и гонад, высокая доля (51%) стерильных рыб, указывают на триплоидию радужной форели американского происхождения.

6. Сегрегация цитоплазматического слоя в превителлогенных ооцитах яичников кокани, интродуцированной в Толмачёвское водохранилище и оз. Демидовское, видоспецифична, и исчезает в процессе вителлогенеза.

7. Аномалии половых клеток в гонадах самок и самцов двух изученных видов лососей, возникающие под воздействием различных факторов окружающей среды, цитологически сходны, что отражает неспецифическую реакцию половых клеток на неблагоприятные внешние воздействия.

Список работ, опубликованных по теме диссертацииПубликации в изданиях, рекомендованных ВАК

Павлов Е.Д., Микодина Е.В., Седова М.А., Емельянова Н.Г., Маркевич Г.Н. 2010. Состояние гонад жилой нерки *Oncorhynchus nerka* из Толмачёвского водохранилища // Вопр. ихтиологии. Т. 50. № 3. С. 356–364.

Павлов Е.Д., Нгуен Вьет Туи, Нгуен Ти Хуан Ту. 2010. Состояние половых желёз молоди триплоидной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях южного Вьетнама после искусственной инверсии пола // Вопр. ихтиологии. Т. 50. № 5. С. 675–684.

Публикации в прочих изданиях

Седова М.А., Самарский В.Г., **Павлов Е.Д.** 2008. Состояние гонад заводской молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) в зависимости от сроков начала её кормления // Чтения памяти В.Я. Леванидова. Вып. 4. Владивосток: Дальнаука. С. 339–345.

Павлов Е.Д., Маркевич Г.Н. 2010. Состояние половых желёз жилой формы нерки *Oncorhynchus nerka* из оз. Демидовское (Камчатский полуостров) // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб: Тез. докл. Межд. конф. Санкт-Петербург, СПб.: ГосНИОРХ. С. 154–157.

Микодина Е.В., Ганжа Е.В., **Павлов Е.Д.** 2010. Некоторые биохимические показатели двухгодовиков триплоидной радужной форели в условиях южного Вьетнама // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Мат-лы III Межд. конф. с элементами школы для молодых учёных, аспирантов и студентов. Петрозаводск: КарНЦ РАН. С. 117–119.

Павлов Е.Д. 2010. Формирование половых желёз радужной форели в условиях южного Вьетнама // Вклад молодых учёных и специалистов в рыбохозяйственную науку России: Тез. докл. Межд. конф. Санкт-Петербург, СПб.: ГосНИОРХ. С. 137–139.

Nguyen Thi Nga, Vo Thi Ha, Nguyen Duy Toan, **Pavlov E.D.**, Nguyen Viet Thuy. 2010. The preliminary study result of reproduction structure of *Oncorhynchus mykiss*, inbreeding on Klong-Klanh fish farm, Lamdong Province // Proc. of Sci. Works on Ecology between 2008 and 2010. Vientam-Russian Tropical Center, Agricultural Press, Hanoi, Vietnam. P. 33–37 (in Vietnam).



Подп. в печать 19.01.11 Объем 1,5 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 27.
ВНИРО. 107140, Москва, В.Красносельская, 17