

На правах рукописи



ЗЕЛЕННИКОВ
Олег Владимирович

**ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ РАННЕГО ООГЕНЕЗА НА РАЗВИТИЕ
ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У РЫБ**

03.02.06 – ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2021 г.

Работа выполнена в Федеральном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный консультант: **Селюков Александр Германович**
доктор биологических наук, доцент, профессор
кафедры зоологии и эволюционной экологии
животных ФГАОУ ВО «Тюменский
государственный университет»

Официальные оппоненты: **Лукин Анатолий Александрович**
доктор биологических наук, профессор,
начальник Федерального селекционно-
генетического центра рыбоводства (ФСГЦР),
филиал ФГБУ «Главрыбвод», заместитель
начальника ФГБУ «Главрыбвод»

Воскобойникова Ольга Степановна
доктор биологических наук, главный научный
сотрудник Зоологического института РАН

Минеев Александр Константинович
доктор биологических наук, старший научный
сотрудник, Самарского федерального
исследовательского центра РАН, Института
экологии Волжского бассейна РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский
государственный университет». г. Томск

Защита состоится 26 мая 2021 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного
совета Д 307.004.04 при Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО») по адресу: г. Москва, ул. Верхняя
Красносельская, д. 17.

Телефон: 8-499-264-90-90, электронный адрес kzh@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте
ФГБНУ «ВНИРО»: http://www.vniro.ru/files/disser/2020/zelenikov_ov.pdf

Автореферат разослан «__» февраля 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук



Жукова
Кристина Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Как известно, само становление и развитие науки Ихтиологии стимулировалось сначала совершенствованием и увеличением масштабов промысла, а затем еще и развитием разных форм аквакультуры. Можно полагать, что именно степенью «близости» к практическому использованию и объясняется тот факт, что воспроизводительная система у рыб изучена крайне неравномерно. Подавляющее большинство работ в этом направлении выполнено на сравнительно взрослых особях – половозрелых или близких к половому созреванию. У них изучено большинство аспектов функционирования воспроизводительной системы: структура преоптического ядра гипоталамуса, гипофиза и стероидсекреторных клеток гонад, динамика гонадотропных и половых стероидных гормонов в крови и их роль в регуляции развития половых желез, развитие половых клеток у рыб разных систематических групп и с разной периодичностью полового созревания и другие вопросы. Все полученные данные в той или иной степени помогали либо установить исходные параметры динамики численности рыб, либо способствовали разработке биотехники их искусственного воспроизводства.

Исследованию гонадо- и гаметогенеза у молоди рыб посвящалось и посвящается до настоящего времени несоизмеримо меньше работ. Очевидно, что такие обстоятельства как слабая дифференциация органов воспроизводительной системы – крупноклеточной области гипоталамуса, гипофиза, стероидсекреторных клеток и гонад, низкая концентрация гонадотропных и стероидных гормонов в крови и гомогенатах ткани создают определенные трудности при исследовании развития репродуктивной системы у молоди по сравнению с взрослыми особями. Однако основная причина относительно слабой изученности раннего гаметогенеза у рыб – явная «отдаленность» результатов большинства работ от практического использования. Непосредственно связаны с применением результаты работ только по одной из тем – дифференцировке пола, и не удивительно, что именно

ей посвящалось и посвящается до настоящего времени абсолютное большинство всех исследований, выполненных в области раннего гамето- и гонадогенеза (Персов, 1969; Nakamura et al., 1998; Baroiller, Guiguen, 2001; Devlin, Nagahama, 2002 и другие).

При выраженном преобладании работ, посвященных анализу дифференцировки пола, всем остальным аспектам функционирования репродуктивной системы у молоди рыб уделялось значительно меньше внимания. Например, таким как развитие стероидсекреторных клеток, динамика пополнения и структурирования фонда ооцитов периода превителлогенеза, влияние токсических веществ и соединений на темп развития гонад и другим. Без должного внимания оставалось и то направление, которое в общем виде можно сформулировать следующим образом: детерминация в раннем возрасте дефинитивных параметров воспроизводительной системы у круглоротых и рыб. Его разработке и посвящена представленная диссертация.

Цель и задачи исследования. С использованием комплекса цито-, гисто- и биохимических подходов установить соотношение между динамикой фонда ооцитов у молоди рыб и становлением дефинитивных параметров репродуктивных показателей для управления процессами воспроизводства рыбных запасов. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать онтогенетические, цитологические и эндокринные аспекты инверсии пола у молоди круглоротых и рыб, определить роль раннего оогенеза в реализации этого процесса и с использованием половых стероидных гормонов корректировать его естественный ход.

2. Выявить динамику формирования фонда половых клеток при становлении моно- и полициклии у круглоротых и рыб; определить роль половых стероидных гормонов в становлении моноциклии.

3. У молоди рыб разных видов определить динамику формирования фонда ооцитов в естественной среде обитания и при содержании в

искусственных условиях, а также после токсического, температурного и гормонального воздействий.

4. Выявить темп оогенеза у молоди горбуши и кеты при их естественном воспроизводстве и заводском разведении.

5. Определить значение превителлогенного периода в оогенезе для темпа полового созревания у разных видов лососевых рыб.

Степень разработанности научного направления. Несмотря на то, что исследованию воспроизводительной системы у молоди рыб посвящалось меньшее внимание, чем работе со взрослыми особями, в научной литературе постепенно накапливались данные, указывающие на то, что именно в раннем возрасте происходит становление важнейших показателей воспроизводительной системы – возраста полового созревания, величины плодовитости, соотношения полов и другие. Например, была установлена связь между темпом роста ооцитов начала превителлогенеза и возрастом полового созревания у лососевых рыб (Иевлева, 1985; Мурза, Христофоров, 1991). Было показано, что оказывая сходное воздействие на молодь рыб при различном состоянии гонад, можно добиться либо замедления (Чмилевский, 1982; 1985), либо, напротив, ускорения их полового созревания (Чмилевский, Лаврова, 1990) и другие.

За годы нашей работы (с 1989 по 2019 год) изученность процессов раннего гаметогенеза изменилась в разной степени. По-прежнему наиболее изучаемыми в разных аспектах остались вопросы дифференцировки пола (Kanamori, 1997; Guiguen et al., 1998; D'Cotta et al., 2001; Strussmann, Ito, 2005; Okutsu et al., 2006; Blanco-Vivas et al., 2011; Емельянова и др., 2013; Chen, Ge, 2013; Senior, Nakagawa, 2013; Geffroy, Bardonnnet, 2016 и другие). При этом если ранее инверсия пола как естественная, так и индуцированная, рассматривалась как частный случай дифференцировки пола и самостоятельно практически не изучалась, то в последние 20-30 лет именно эта тема стала наиболее востребованной специалистами (Selim et al., 2009; Sun et al., 2010; Senior, Nakagawa, 2013; Navara, 2018 и другие). Интерес к ней вызван двумя

основными причинами, каждая из которых указывает на важное практическое значение. С одной стороны, знание закономерностей инверсии пола необходимо для получения однополых поколений, которые все шире применяются в современной аквакультуре для товарного выращивания рыб разных видов (Tuan et al., 1999; Afonso, Lebouté, 2003; Vinas et al., 2013). С другой стороны, эта тема стала актуальной в связи с анализом проблемы масштабной инверсии пола у рыб в естественных водоемах под воздействием различных поллютантов в пресных (Lambert, Janssen, 1995; Katsu et al., 2007) и морских водах (De Metrio et al., 2003; Kibrby et al., 2004; Sunobe, Nagiwara, 2013).

Остальные направления за эти годы пополнялись не так интенсивно, а некоторые темы – в значительной мере, нашими работами. Например, до настоящего времени крайне немногочисленными остаются данные о влиянии токсического воздействия на ход гонадо- и гаметогенеза у молоди рыб, полученные в ходе лабораторных экспериментов.

В последние годы заметно увеличилось число исследований ооцитов периода превителлогенеза, при этом полученные данные оказываются весьма разноплановыми. Например, появились новые сведения об организации ядра и цитоплазмы (Kobayashi, Iwamatsu, 1999; 2000; Guimares, Guagio-Grassiotto, 2001), о регулировании развития этих клеток половыми стероидными гормонами (Matsubara et al., 2003; Lokman et al., 2007; Falahatkar, 2015). Исследователям по-прежнему актуальны вопросы периодизации ооцитов периода превителлогенеза (Abbasi et al., 2000; Журавлева и др., 2005; Koriejewska, Szeserbowski, 2005), их численности (Bleil, Oeberst, 1998; Подушка, 1999; Coward, Bromage, 1999; Зайцева и др., 2010; 2017) и другие. Однако нам не были известны данные об исходном формировании их фонда или динамике пополнения из числа мейоцитов, что потребовало проведения специальной работы в этом направлении.

Наконец, в последние годы заметно пополнились данные по гаметогенезу тихоокеанских лососей (Анохина, 1999; Павлов и др., 2010; Артамонова и др.,

2018 и другие), которые в силу целого комплекса причин являются едва ли не самой изучаемой группой рыб в мире. Этому способствуют широкое использование этих рыб в качестве объекта промысла, их искусственное воспроизводство, доступность для экспериментальных исследований (Fujiwara et al., 1997; Amano et al., 2001; Munakata et al., 2000; Fukada et al., 2003; Sopinka et al., 2016 и другие), а также то обстоятельство, что тихоокеанские лососи являются ресурсом стран с высокоразвитой фундаментальной и прикладной наукой – России, США, Канады и Японии. Однако в нашей области исследователей интересовало, главным образом, развитие ооцитов старшей генерации; динамике фонда гониев и мейоцитов внимания не уделяли. Имеющиеся же данные о динамике пополнения унитарного фонда ооцитов (Грачев, 1971) нашим представлениям противоречили.

С учетом всех сведений, полученных как другими авторами, так и нами, представленная работа является обобщением, имеющим перспективы для дальнейшей разработки специалистами. Так, наиболее актуальными с точки зрения объема исследований остаются востребованные в современной аквакультуре работы в области дифференцировки и инверсии пола. Большие перспективы для дальнейших исследований открываются и при анализе влияния токсических соединений и естественных экологических факторов в экстремальном проявлении в связи с расширением масштаба научных и прикладных работ эко-токсикологической направленности.

Объекты исследования

Все исследования были проведены в период с 1989 по 2019 год на 15 видах круглоротых и рыб: **речная минога** *Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758; **ручьевая минога** *Lampetra planeri* Bloch, 1784; **русский осетр** *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833; **дальневосточная сардина** *Sardinops melanosticta* Temminck & Schlegel, 1846; **радужная форель** *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792; **атлантический лосось** онежской популяции *Salmo salar* Linnaeus, 1758; **каспийский лосось** *Salmo caspius* Kessler, 1877; **горбуша** *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum, 1792; **кета** *O. keta* Walbaum, 1792; **нерка** *O.*

nerka Walbaum, 1792; **кижуч** *O. kisutch* Walbaum, 1792; **чавыча** *O. tshawytscha* Walbaum, 1792; **сима** *O. masou* Brevoort, 1856; **данио рерио** *Danio rerio* Hamilton, 1822; **мозамбикская тиляпия** *Oreochromis mossambicus* Peters, 1852. Латинские названия видов приведены в соответствии с каталогом рыб «Eschmeyer's Catalog of Fishes».

Научная новизна. Впервые показана невозможность полноценного перехода ооцитов в период превителлогенеза у самцов ювенильных протогинических гермафродитов. Выявлена волновая динамика формирования фонда ооцитов периода превителлогенеза при полициклическом типе воспроизводства. Показано, что в раннем онтогенезе у самок моноциклических лососевых осуществляется значительное перепроизводство половых клеток, которые в массе подвергаются резорбции. При этом стимулирование митотической активности гониев и начала новых мейотических циклов осуществляется пребыванием рыб в пресной воде. Показана динамика эстрадиола и тестостерона в процессе формирования унитарного фонда ооцитов периода превителлогенеза у моноциклических лососевых и возможность стимулировать развитие дополнительного числа половых клеток у них на разных этапах раннего онтогенеза. Увеличение числа половых клеток у самок полициклических рыб может быть стимулировано гормональным воздействием или содержанием рыб при умеренной токсичности. Воздействие, оказанное до начала превителлогенного роста ооцитов, может привести к увеличению абсолютной плодовитости, оказанное в момент начала роста ооцитов, напротив, к ее уменьшению, оказанное после начала роста ооцитов ни стимулирующего, ни явного негативного влияния на развитие гонад не оказывает. У молоди кеты продемонстрирована периодизация развития яичников при наиболее различных температурных режимах. Выявлена степень разнокачественности в состоянии ооцитов у молоди горбуши и кеты естественного и заводского происхождения и прослежена прямая связь между состоянием гонад у самок кеты в период катадромной миграции и возрастом полового созревания производителей.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ооциты периода превителлогенеза в яичниках генотипических самцов круглоротых и рыб являются потенциально жизнеспособными, их резорбция определяется дефицитом гормонов-эстрогенов, применение которых предотвращает дегенерацию ооцитов и останавливает процесс инверсии пола.

2. У полициклических рыб вступление мейоцитов в период превителлогенеза и их дальнейший рост осуществляется группами, определяя волновой характер формирования репродуктивного фонда. У самок моноциклических лососевых с формированием единственной функциональной генерации ооцитов размножение гониев и инициирование новых мейотических циклов не прекращаются, не замедляются, стимулируются пребыванием в пресной воде; вновь образованные ооциты функциональную генерацию не пополняют и подвергаются тотальной резорбции.

3. Стимулировать увеличение плодовитости у самок моноциклических и полициклических рыб можно, оказывая на них гормональное или умеренно токсичное воздействие до перехода мейоцитов в период превителлогенеза. После формирования фонда ооцитов периода превителлогенеза эти же воздействия явного негативного или стимулирующего влияния на развитие яичников не оказывают.

4. Уровень развития яичников у молоди кеты перед выпуском с рыбоводных предприятий в среднем существенно различается, не зависит от массы рыб, обусловлен суммой накопленных за период выращивания температур и связан с возрастом полового созревания производителей.

Практическая значимость. Главным практическим итогом выполненных работ, имеющих перспективы при проведении исследовательских работ экологической направленности, в том числе экспертного плана, является анализ изменения фонда половых клеток у молоди рыб при его различном клеточном составе в ответ на влияние внешних факторов, в том числе гормональное и токсическое воздействие. При этом

полученные результаты позволяют прогнозировать как непосредственные, так и отсроченные последствия внешнего воздействия на репродуктивную функцию рыб.

Практическая значимость полученных результатов определяется их преимущественным получением на рыбах, являющихся объектом промысла и заводского разведения. У молоди двух основных объектов лососевого промысла – горбуши и кеты – в условиях их современного выращивания на рыбоводных заводах при максимально различных температурных режимах определена периодизация раннего гаметогенеза: начало дифференцировки пола и перехода ооцитов в период превителлогенеза, завершения естественной инверсии пола у самцов горбуши. Определена связь между началом и завершением качественно разных этапов в развитии гонад у молоди горбуши и кеты с этапами эмбрионально-личиночного развития, имеющая значение для дальнейшего совершенствования биотехники разведения этих рыб, в том числе с применением температурных и/или гормональных манипуляций. Определена связь между состоянием гонад у самок кеты в период выпуска с рыбоводных заводов и миграции с естественных нерестилищ с возрастом полового созревания производителей, предоставляющая как дополнительный критерий для его прогнозирования, так и возможности для его изменения. Выращивание радужной форели при температуре 19-20°C представляет дополнительную информацию в связи с расширяющейся практикой ее выращивания за пределами естественного ареала в странах с тропическим климатом. Полученные нами данные по выращиванию каспийской кумжи и онежской формы атлантического лосося в ходе формирования маточных стад этих видов способствуют совершенствованию биотехники их заводского выращивания.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. 1992. Петрозаводск; на совещании «Систематика, биология и биотехника разведения лососевых рыб». 1994. Санкт-Петербург; на конф. «Фундаментальные и прикладные проблемы защиты окружающей среды» 1995. Томск; на конф. «Биологические ресурсы

Белого моря и внутренних водоемов Европейского севера». 1995. Петрозаводск; на совещ. «Экологические проблемы севера европейской территории России». 1996. Апатиты; на симп. «Culture and management of sturgeon and paddlefish». 1996. Сан-Франциско; на Первом конгрессе ихтиологов России. 1997. Астрахань; на симп. «Возрастная и экологическая физиология рыб». 1998. Борок; на семинаре «Виды-вселенцы в европейских морях России» 2000. Мурманск; на конф. «XXI век: молодежь, экология, ноосфера и устойчивое развитие». 2000. Санкт-Петербург; на конф. «Нейроэндокринология - 2000». 2000. Санкт-Петербург; на симп. «Экологические и функциональные основы адаптации гидробионтов». 2000. Санкт-Петербург; на симп. «Czlowiek I srodowisko przyrodnicze pomorza zachodniego». 2001. Szczecin; на конф. «Ранние этапы развития гидробионтов как основа формирования биопродуктивности и запасов промысловых видов в Мировом океане». 2001. Москва; на «21-st Conference of European Comparative Endocrinologists». 2002. Bonn; на конф. «Современные проблемы водной токсикологии». 2002. Борок; на отчетной сессии ЗИН РАН. 2003. Санкт-Петербург; на конф. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». 2004. Петрозаводск; на III, IV, VIII, IX, XII, XX сессии МБС СПбГУ в 2002, 2003, 2007, 2008, 2011, 2019 гг.; на «5th International Symposium Fish Endocrinology». 2004. Castellon (Spain); на IX конф. «Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря». 2004. Архангельск; на конф. «Современные проблемы водной токсикологии» 2005. Борок; на конф «Aquaterra-2005». 2005. Санкт-Петербург; на 2-ой конф. «Экологические исследования беломорских организмов». 2007. Санкт-Петербург; на конф. «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований». 2008. Вологда; на конф. «Экологические проблемы Севера». 2008. Архангельск; на конф. «Воспроизводство тихоокеанских лососей». 2012. Южно-Сахалинск; на VII конф. «Океанологические исследования». 2016. Владивосток; на конф. «Лососевые рыбы: биология, охрана и воспроизводство». 2017. Петрозаводск; на конф. «Современное состояние и перспективы развития лососевого хозяйства на

Дальнем Востоке России». 2017. Южно-Сахалинск; на конф. «Искусственное воспроизводство тихоокеанских лососей на Дальнем Востоке России». 2018. Южно-Сахалинск; на VIII конф. «Чтения памяти проф. В.Я. Леванидова». 2019. Владивосток.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 118 работ, в том 43 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура работы. Диссертация изложена на 371 странице машинописного текста, состоит из введения, 8 глав, выводов и списка литературы. Работа содержит 41 таблицу, 31 график и схему, а также 249 микрофотографий. Список цитированной литературы включает 812 публикаций.

Благодарности. За 32 года, которые прошли с момента начала моей учебы в Санкт-Петербургском государственном университете, затем обучении в аспирантуре и последующей работе на кафедре ихтиологии и гидробиологии, мне оказывали помощь и поддержку многие специалисты. Благодаря их труду и заботе в конечном итоге и состоялась представленная диссертационная работа.

В первую очередь я хочу выразить признательность моему научному консультанту профессору Тюменского государственного университета А.Г.Селюкову за большой труд в редактировании рукописи и ценные советы. Я очень благодарен моему студенческому руководителю Д.А.Чмилевскому и моим многолетним учителям К.Е.Федорову и Ю.К.Кузнецову, чей вклад в мое развитие как специалиста является бесценным.

Я хочу выразить особую признательность моему многолетнему соавтору М.В.Мосягиной, а также преподавателям и коллегам по кафедре за многолетнее обсуждение проведенных работ: Л.С.Краюшкиной, Н.В.Максимовичу, Г.Л.Травкиной, И.А.Стогову, А.В.Герасимовой, Д.Л.Лайусу, П.П.Стрелкову, М.В.Иванову, Т.С.Ивановой, Н.В.Поляковой, Е.А.Мовчан, Ю.А.Феклову, С.Ю.Анацкому. Я хочу поблагодарить всех моих учеников за совместный труд и особо отметить Е.Г.Оставную, Г.Е.Лунева, Е.В.Сабанову, В.С.Коломыцева.

Будучи преподавателем университета, я общался с коллегами из различных исследовательских институтов. Мы выполняли совместные научные работы и обсуждали полученные результаты. За эти работы и это общение я хочу отдельно поблагодарить Е.А.Дорофееву, В.М.Голода, Т.Б.Семенкову, Л.В.Баюнову, В.Н.Лемана, Е.Н.Артюхина, И.А.Баранникову, И.В.Тренклера, П.Е.Гарлова, А.А.Герасимова. Большое спасибо сотрудникам лаборатории за помощь в проведении лабораторных исследований: А.А.Ивойлову, Н.В.Пименовой, Н.А.Тихомировой.

Отдельно хочется поблагодарить специалистов управления ФГБУ «Сахалинрыбвод», работников рыбоводных заводов, ихтиологов, сотрудников различных учреждений, которые в течение 22 лет оказывали мне помощь в сборе материалов на рыбоводных заводах и в природной среде: Г.С.Рудакову, В.Г.Самарского, К.А.Проскурякова, С.И.Борзова, М.С.Мякишева, С.С.Макеева, А.А.Ворожцову, В.П.Погодина, Л.К.Федорову, Е.Д.Романчук, В.Е.Дубровскую, С.В.Сидорову, Т.Н.Любаеву, В.Я.Любаева, О.А.Барковскую.

Я сердечно благодарен моим родителям И.А.Зеленниковой и В.В.Зеленникову за постоянную помощь и неизменную поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Материалы и методы

Все материалы, представленные в диссертации, были получены в ходе лабораторных экспериментов, а также работы на рыбоводных заводах и проведения экспедиционных исследований.

Эксперименты были выполнены на молоди русского осетра, радужной форели, мозамбикской тиляпии, а также молоди четырех видов тихоокеанских лососей – горбуши, кеты, кижуча и симы. Основная программа содержала 27 экспериментов (47 вариантов; рис. 1) продолжительностью от четырех недель до двух лет. В ходе проведения экспериментов рыб в разном возрасте и при различном состоянии половых желез обрабатывали половыми стероидными гормонами, которые вводили в виде инъекций или задавали с кормом,

выращивали при пониженной или постоянной температуре, выдерживали при вышенной кислотности воды; исследовали развитие гонад у гибридных особей, а также при необычных для молоди рыб условиях содержания.

Работы на рыбоводных заводах и в полевых условиях проводили в период с 1997 по 2019 гг., исследуя молодь всех шести видов тихоокеанских лососей как в течение полного периода выращивания зародышей, личинок и мальков, так и на завершающих этапах их содержания. Все работы провели на 37 рыбоводных заводах, расположенных на территории Ленинградской, Мурманской, Магаданской, Сахалинской областей и Камчатского края: Адотымовский, Анивский, Березняковский, Бахура, Бухта Оля, Буюкловский, Долинка, Залом, Игривая, Калининский, Кандалакшский, Китовый, Красноярка, Куйбышевский, Курильский, Лазовой, Лесной, Малкинский, Мануй, Монетка, Нитуй, Ольская ЭПАБ, Охотский, Побединский, Поречье, Пугачевский, Рейдовый, ФГБУ «Ропша», Скальный, Соколовский, Сокольниковский, Таранайский, Тихая, Тымовское, Урожайный, Фирсовка, Ясноморский. Отлов рыб проводили в реках Черная (Ленинградская обл.), Большая (Камчатский край), Бахура, Быстрая, Крохалина, Курилка, Лютога, Очепуха, Тымь, Побединка, Пугачевка, Рейдовая, Рыбацкая, Семга, Таранай, Ударница (Сахалинская обл.), заливах Простор и Курильский, проливе Татарский, озере Сопочное (Сахалинская обл.), озере Курильское (Камчатский край).

Половые железы рыб, пойманных в естественной среде и взятых на рыбоводных заводах, контрольных и подопытных особей и рыб, выращиваемых в лабораторных условиях, фиксировали в жидкостях Буэна или Серра и обрабатывали гистологически согласно общепринятым методикам (Микодина и др., 2009). При приготовлении гистологических препаратов для каждой особи получали от 50 до 200 серийных срезов толщиной 5 мкм и окрашивали их железным гематоксилином по Гейденгайну. В некоторых случаях докрасивали эозином или кислым фуксином. Всего были обработаны гонады более 9000 особей.

№	Объем	Концентрация гормона		
1.	3 мкл	1%	-48	-----1
2.1.	---	0,001%	-19	-----57
2.2.	---	0,01%	-19	-----57
2.3.	---	0,1%	-19	-----57
2.4.	---	1%	-19	-----57
3.	---	1%	1	-----63
4.	---	Масло	14	-----90
5.1.	---	0,1%	-22	-----25
5.2.	---	0,1%	-22	-----1-----25
5.3.	---	0,1%	1	-----7-----14-----35
6.1.	---	0,1%	1	-----38
6.2.	---	0,1%	14	-----126
6.3.	20 мкл	0,1%	14	-----38
7.	15 мкл	0,1%	16	-----160
8.	3 мкл	0,1%	14	-----160
<u>Доза гормона мг/кг корма (* мг/кг)</u>				
9.	30*		16==23	-----90
10.	50		62=====92	
11.1.	100		72=====109	----144
11.2.	100		72=====144	
12.1.	20		58=====84	-----128
12.2.	20		58=====100	---128
12.3.	100		58=====84	-----128
12.4.	100		58=====100	---128
13.1.	20		178==185	-----204
13.2.	20		178==195	-----204
13.3.	20		178=====204	
14.	100-15		114=====218	
15.	100		335==363	
16.	100		702==730	
<u>pH воды</u>				
17.	pH 4,0		20=====50	-----150
18.1.	pH 4,0		22=====45	-----171
18.2.	pH 4,0		22=====60	-----171
19.	pH 4,4.		165=====190	-----220
20.1.	pH 4,6		1=====63	
20.2.	pH 4,6		1=====25	-----63
20.3.	pH 4,6		1-----25=====63	
<u>Температура °C</u>				
21.1.	1,3-1,8		-9=====5	-----112
21.2.	---		1=====14	-----112
21.3.	---		23=====37	-----112
21.4.	---		28=====42	-----112
21.5.	---		37=====54	-----112
21.6.	---		48=====62	-----112

Рис. 1. Схема опытов с использованием горбуши (опыты 1-8, 10, 11, 20), радужной форели (9), кижуча (12, 13), кеты (14, 21), симы (15, 16), мозамбикской тилапии (17, 18) и русского осетра (19). В ходе опытов делали инъекции тестостерона (опыты 1-3), оливкового масла (опыт 4), эстрадиола (опыты 5-8), задавали эстрадиол с кормом (9-16), выдерживали рыб при пониженной pH воды (17-20) и температуре (21). Цифрами обозначен возраст рыб до (с минусом) или после вылупления. Красным цветом выделены возраст в момент инъекции или периода воздействия. В каждом опыте был контрольный вариант.

Для исследования стероидсекреторных клеток (СК) фиксацию гонад проводили в 6%-ном глутаральдегиде на какодилатном буферном растворе, и после промывки дофиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 . Все материалы заливали в Эпон-812. Стероидсекреторные клетки в гонадах идентифицировали по характерным для них признакам: наличию митохондрий с трубчато-везикулярными кристами, агранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭПР), липидных включений и другим (Lofts, Vern, 1972). Для оценки функциональной активности СК измеряли диаметры самих клеток, их ядер, митохондрий, канальцев ЭПР и липидных включений, а также вычисляли относительные объёмные плотности этих структур (Weibel, 1969).

Половые стероидные гормоны определяли в гомогенате тканей, применяя иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) (Semenkova et al., 2002).

Полученные данные обрабатывали статистически, используя критерии Стьюдента, Манн-Уитни, ранговый коэффициент корреляции Спирмена и коэффициент парной корреляции Пирсона.

Предметом исследования в работе являются половые клетки трех первых периодов развития, которые формируются в гонадах у молоди рыб – первичные половые клетки и гонии, ооциты периодов ранней профазы мейоза и периода превителлогенеза (рис. 2), темп роста этих клеток и динамика их фонда в связи со становлением ряда дефинитивных параметров воспроизводительной системы у рыб.

В основе всей работы лежит количественный анализ фонда половых клеток, и практически все результаты были получены в многочисленных линиях сравнения, предусмотренных при планировании исследований. Анализировали состояние гонад у рыб в течение периода роста, т.е. в разном возрасте и при разных размерах; у контрольных и подопытных рыб; у заводских и «диких» мальков; при выпуске с заводов и скате с природных нерестилищ; при выпуске с заводов, различающихся термическими условиями и катадромной миграции из рек в разные годы и в разных регионах; у молоди разных видов, но одинакового возраста и размера и другие.

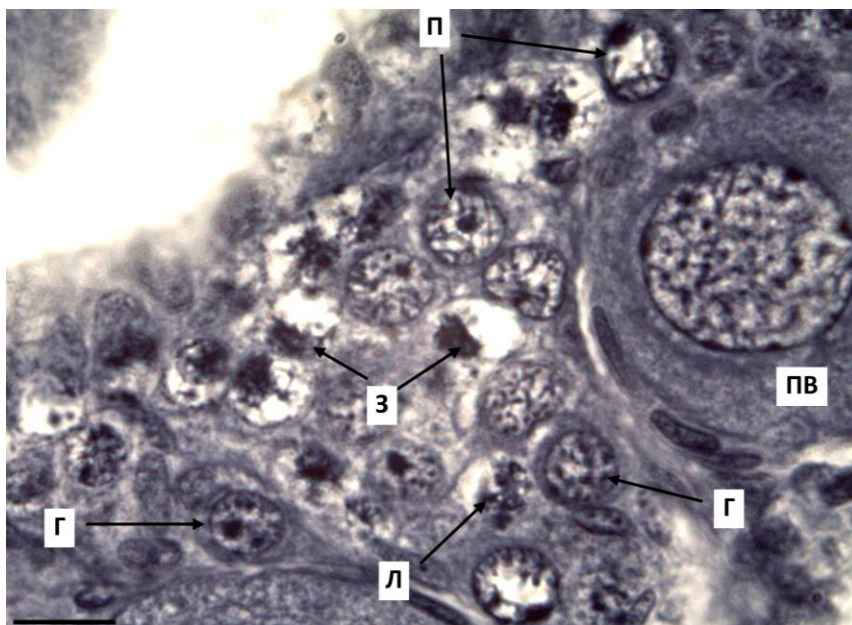


Рис. 2. Внешний вид: гониев (Г), ооцитов периода ранней профазы мейоза в состоянии лептотены (Л), зиготены (З), пахитены (П) и периода превител-логенеза (ПВ) в яичнике у малька кеты. Шкала = 20 мкм.

При исследовании динамики формирования фонда ооцитов периода превителлогенеза количество клеток разных размерных групп рассчитывали в объёме среза обеих гонад толщиной, равного диаметру самого крупного ооцита, используя формулу для расчета количественного соотношения разноразмерных половых клеток (Беляев и др., 2004). Во всех остальных случаях состояние гонад оценивали по ряду количественных показателей: уровню развития половых клеток старшей генерации, числу половых клеток всех состояний, массе гонад и (или) их площади на поперечных срезах, диаметру ооцитов. Поскольку решающее значение в анализе полученных данных мы отдаем их количественному анализу, то и представлены они в работе преимущественно в табличном варианте, позволяющем точные цифровые значения снабдить статистическими дополнениями.

Глава 2. Развитие фонда половых клеток у молоди круглоротых и рыб в связи с естественной и индуцированной инверсией пола

Исследуя ход естественной инверсии пола у тихоокеанского лосося горбуши, мы вновь показали, что мейотические деления половых клеток начинаются уже в период эмбрионального развития, как это было известно и ранее (Персов, 1969). Мы можем лишь добавить, что происходит это при любом температурном режиме как при максимально высокой температуре в

лабораторных условиях, так и при наиболее низкой температуре в условиях «холодноводных» рыбоводных заводов. Мы также установили, что эффект тотальной феминизации гонад у рыб передается по женской линии, поскольку фонд ооцитов и последующая инверсия пола у самцов осуществлялась только у горбуши и той гибридной формы, где икру горбуши осеменяли спермой сима. Сама сима и реципрочный гибрид сима × горбуша были обычными гонохористами с прямым определением пола.

С помощью количественного анализа фонда половых клеток было установлено, что в момент вылупления молоди различить гонады будущих самок и самцов по числу и составу половых клеток невозможно. Лишь в дальнейшем у части рыб происходит замедление темпа пополнения фонда ооцитов, и именно такие особи вступают на путь инверсии пола. Следует подчеркнуть, что резорбция ооцитов у самок идет не менее интенсивно, чем у будущих самцов, и только замедление темпа оогенеза со временем позволяет выявить гонады мужских особей. Вторым важнейшим обстоятельством является то, что инверсия пола у генотипических самцов завершается не раньше, чем ооциты старшей генерации у них вступят в период превителлогенеза. Причем происходит это у всех видов рыб, независимо от систематического положения и продолжительности периода полового созревания. На определенном этапе инверсии будущие семенники, например, у горбуши, речной миноги и данио практически не различаются (рис. 3).

В ходе ультраструктурного анализа половых желез установили, что если у самок после начала превителлогенного роста стероидсекреторные клетки присутствуют как в строме гонад, так и в гранулезе фолликулов, то у самцов эти клетки, отличающиеся высокой секреторной активностью, присутствуют исключительно в строме половых желез. Таким образом, в отличие от самок, у самцов полноценного перехода половых клеток к превителлогенному росту не происходило. Такую же картину выявили в ходе ультраструктурного исследования гонад у речной миноги и данио рерио.

Исследуя экдокринные аспекты инверсии пола, установили, что инъекции тестостерона, даже в максимальной из использованных дозировок, не предотвратили тотальную феминизацию гонад. Эффект гормонального воздействия выразился в дозозависимом уменьшении фонда ооцитов у генотипических самок и выраженной асинхронности в развитии половых клеток (рис. 4А). В свою очередь инъекции эстрадиола в желточный мешок в любой из дозировок предотвращали резорбцию ооцитов и обеспечивали их дальнейший рост. Следует отметить, что даже однократная инъекция эстрадиола останавливала процесс естественной инверсии пола на том этапе, с которым совпадала (рис. 5).



Рис. 3. Состояние яичников у горбуши (А) и семенников у горбуши (Б), ручьевой миноги (В) и данио рерио (Г) в период естественной инверсии пола. Шкала = 50 мкм.

Чем в более раннем возрасте оказывали гормональное воздействие, тем меньше впоследствии различались яичники у генотипических самок и самцов. Например, после однократной инъекции гормона в возрасте 14 сут после вылупления, к тому моменту как ооциты старшей генерации вступили в период вителлогенеза, и для самок была характерна единственная генерация ооцитов (рис. 4Б). С большой уверенностью можно было предположить, что самки с небольшим числом разноразмерных ооцитов являлись генотипическими самцами, у которых в момент инъекции в гонадах сохранялись лишь единичные ооциты (рис. 4В). Самки же с большим числом разноразмерных ооцитов (рис. 4Г) могли

быть, как генопитическими самцами, так и самками с индивидуально более выраженной, чем у остальных, асинхронностью в развитии ооцитов.

Следует отметить, что у самцов горбуши, которым была сделана инъекция эстрадиола, стероидсекреторные клетки формировались там же, где и у подопытных самок, в том числе в грануле ооцитов (рис. 6А). Точно также формировались стероидсекреторные клетки в грануле ооцитов у молоди горбуши после завершения процесса естественной инверсии пола, и у других видов лососей, у которых экзогенным эстрадиолом стимулировали передифференцировку обычных семенников в яичники (рис. 6Б). Эти эксперименты были проведены на молоди горбуши, симы, кеты и кижуча.

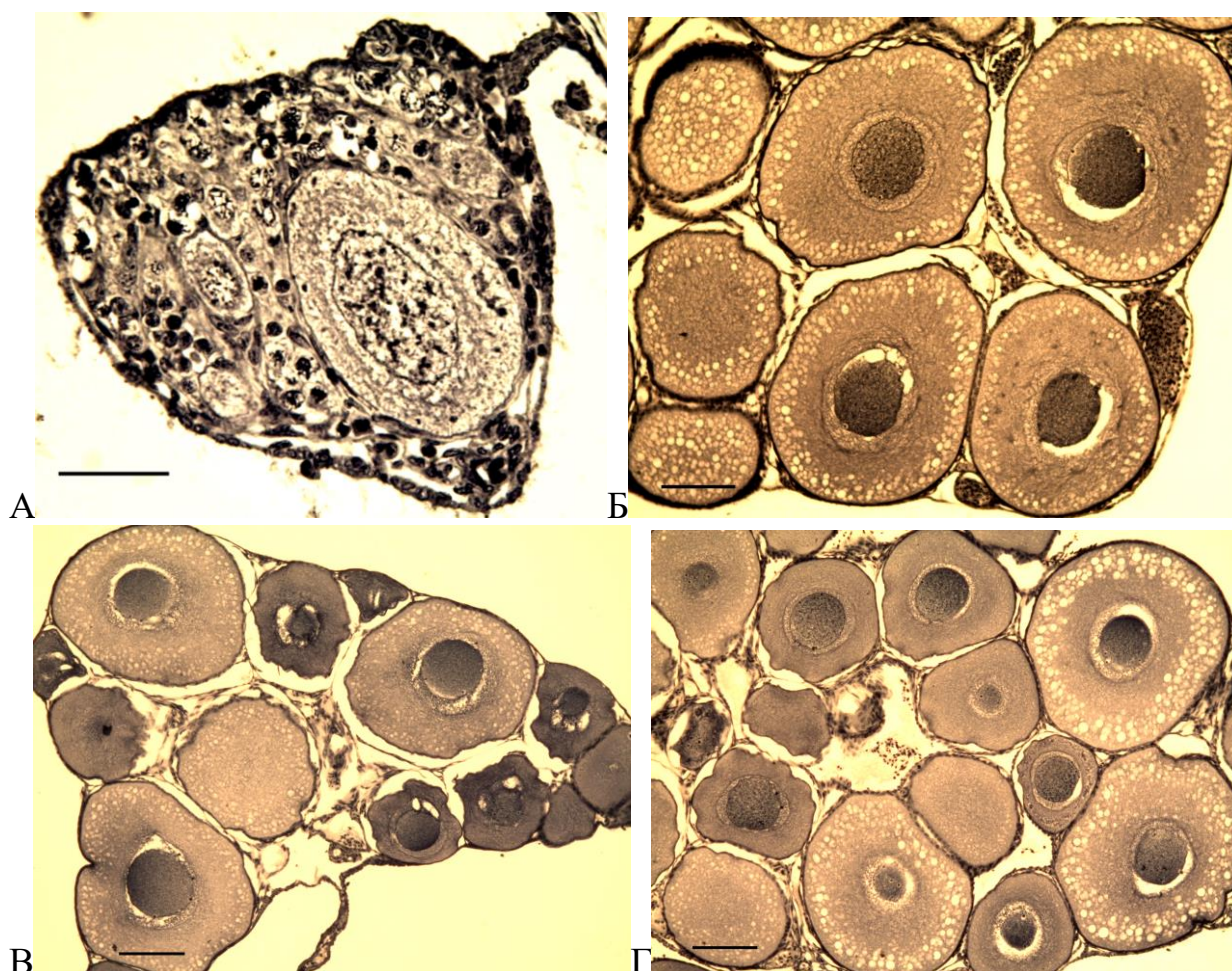


Рис. 4. Состояние гонад у горбуши после инъекции тестостерона (А) и эстрадиола (Б-Г). Можно видеть асинхронное развитие ооцитов после гормонального воздействия у самок (А) и у генотипических самцов (В, Г). Шкала А = 50; Б-Г = 100 мкм.

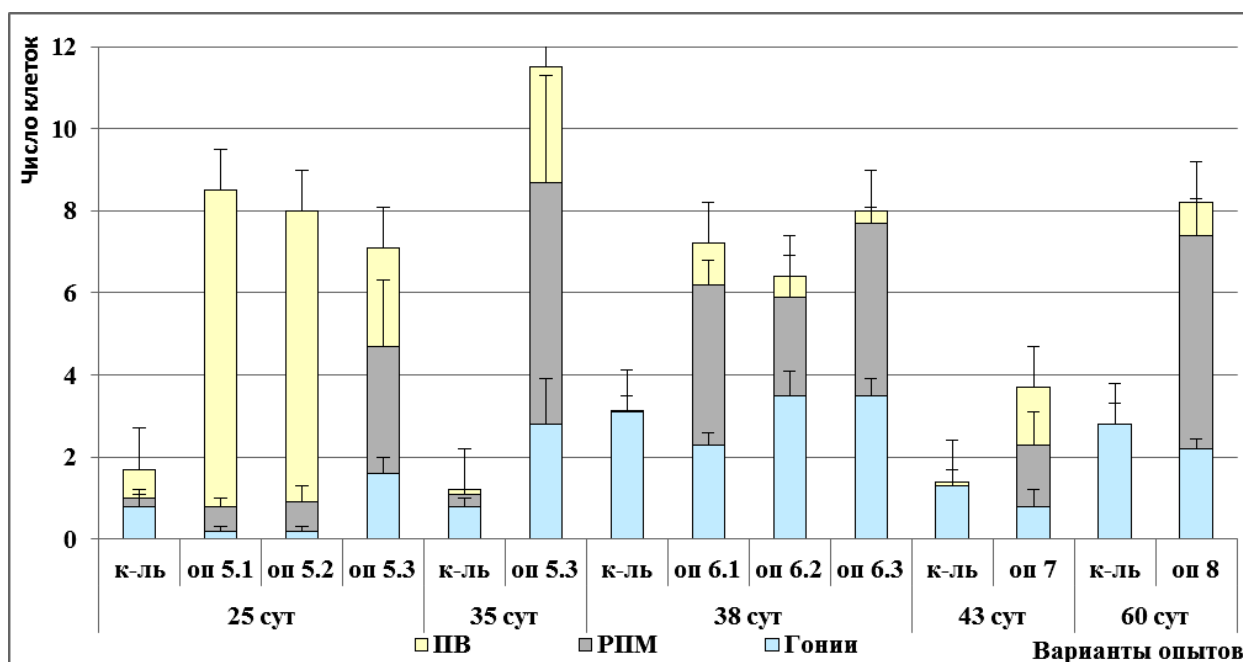


Рис. 5. Число гониев, ооцитов периода ранней промезы мейоза (РПМ) и превителлогенеза (ПВ) у самцов горбуши после инъекции эстрадиола-дипропионата за 22 сут до вылупления (оп 5.1); за 22 сут и в день вылупления (оп 5.2); в возрасте: 1, 7 и 14 сут (оп 5.3); 1 сут (оп 6.1); 14 сут (оп 6.2, 6.3 и 8) и 16 сут (оп 7).

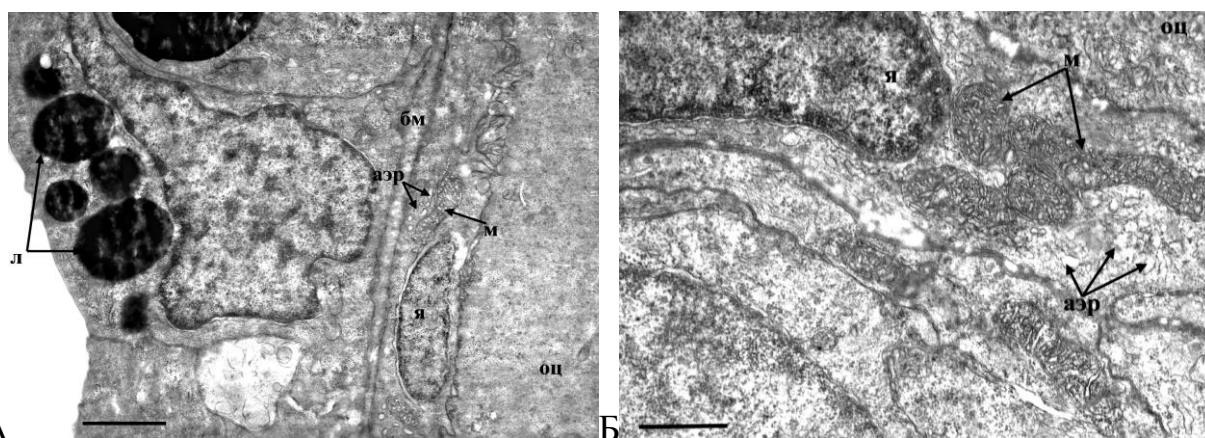


Рис. 6. Стероидсекреторные клетки в грануле превителлогенного ооцита в гонадах самцов горбуши (А) и кижуча (Б) после воздействия экзогенным эстрадиолом. Обозначения: ОЦ – ооцит, Я – ядро СК, БМ – базальная мембрана, митохондрии (М) с трубчато-везикулярными кристами, каналцы агранулярного (АЭР) эндоплазматического ретикулула, липиды (Л). Шкала = 2 мкм.

Глава 3. Формирование фонда половых клеток у молоди круглоротых и рыб при становлении цикличности воспроизводства

Исследуя динамику формирования фонда ооцитов периода превителлогенеза у полициклических рыб на примере радужной форели, в первую очередь отметили, что состояние гонад у одновозрастных рыб существенно различалось. У рыб в возрасте 10-12 мес. мы выявили шесть, а в возрасте 20 мес. –

пять различных вариантов структуризации фонда превителлогенных ооцитов. Так, у рыб в возрасте 20 мес. в первом варианте большую часть фонда ооцитов составляли клетки диаметром 20-55 мкм (табл. 1). У рыб во втором варианте преобладали ооциты диаметром 56-91 мкм, в третьем варианте – ооциты диаметром 92-127 мкм и, наконец, у рыб в четвертом варианте – ооциты 4 размерной группы диаметром 128-163 мкм (табл. 1). У рыб в пятом варианте в яичниках было много наиболее крупных ооцитов – 4, 5, 6 и 7 размерных групп. Однако, в отличие от рыб остальных вариантов, в последнем случае в гонадах были многочисленными и ооциты начального этапа превителлогенеза диаметром 20-55 мкм. Таким образом, формирование фонда ооцитов периода превителлогенеза у полициклической радужной форели носит явно выраженный волновой характер.

Таблица 1.

Число ооцитов периода превителлогенеза разных размерных групп у радужной форели

Масса рыб, г	Относительное число ооцитов различных размерных групп, %						
	I 20-55*	II 56-91	III 92-127	IV 128-163	V 164-199	VI 200-235	VII >236
Возраст 10-12 мес. Группы мелких и крупных особей							
55,4±2,0	44,5±3,7	27,9±2,2	19,2±2,9	7,5±1,9	0,9±0,6	—	—
78,3±3,4	46,8±2,3	28,1±1,7	18,3±2,0	6,5±1,0	0,3±0,1	—	—
Возраст 10-12 мес. Варианты в структуре фонда ооцитов							
66,0±4,0	53,6±1,1	26,0±1,4	14,6±0,9	5,6±1,1	0,2±0,04	—	—
67,7±11,7	47,6±1,7	39,3±0,9	8,6±0,9	4,2±1,2	0,4±0,1	—	—
62,0±5,9	37,8±3,5	29,0±0,9	27,5±2,8	5,6±0,8	0,2±0,1	—	—
67	16,1	56,8	26,6	0,4	0,1	—	—
74,7±11,2	38,1±1,7	25,9±1,6	22,9±0,3	12,6±0,8	0,5±0,3	—	—
81	26,2	16,7	28,0	22,0	7,1	—	—
Возраст 20 мес. Группы мелких и крупных особей							
448,3±42,9	30,1±4,2	15,4±2,4	15,8±1,4	15,9±2,2	12,0±1,8	6,2±0,8	4,6±1,3
612,3±32,0	33,9±6,0	24,4±4,8	14,8±3,1	11,3±1,5	7,8±2,6	3,2±0,7	4,6±1,0
Возраст 20 мес. Варианты в структуре фонда ооцитов							
506,0±57,4	41,5±4,6	20,2±1,2	14,3±1,5	9,8±1,4	7,0±1,9	3,9±1,0	3,3±0,4
682,5±30,5	23,1±6,4	36,8±1,6	14,3±0,5	13,0±3,7	6,8±1,7	1,9±0,6	3,9±2,5
615	20,8	25,4	28,6	11,6	5,0	3,4	5,2
546,0±50,0	17,2±6,0	16,7±1,2	19,9±0,1	21,8±1,2	14,0±1,7	6,6±0,1	4,3±1,7
403,3±53,8	35,1±3,7	6,5±1,0	10,4±2,3	16,2±2,2	16,6±2,8	7,6±0,8	7,5±2,6

*Диаметр ооцитов каждой из размерных групп, мкм.**Полужирным шрифтом во всех случаях выделено достоверное увеличение по сравнению со значением для 1-ой группы.

Полученные данные позволили проследить весь цикл перехода превителлогенных ооцитов от I до V размерной группы, на протяжении которого отмечены признаки, по меньшей мере, двухразового пополнения фонда ооцитов периода превителлогенеза за счёт ооцитов периода ранней профазы мейоза. При достижении относительной численности ооцитов двух первых размерных групп до 55-57% следовал переход части клеток в следующую размерную группу. Такие вариации относительной доли ооцитов в каждой из групп свидетельствует о прерывистой неравномерности пополнения фонда ооцитов в период превителлогенеза. В противном случае структура фонда ооцитов оставалась бы относительно стабильной как, например, в первом из рассмотренных вариантов. За счет постепенного пополнения общий фонд ооцитов периода превителлогенеза в период с 10-12 до 20 мес. увеличился в среднем в 9,5 раза.

Первоначально формирование фонда ооцитов у полициклических и моноциклических круглоротых и рыб не различается. У тех и других происходит размножение первичных половых клеток и гониев, вступление гониев в мейоз, а ооцитов периода ранней профазы мейоза – в превителлогенез. Поскольку все эти процессы занимают определенное время, то первоначально в яичниках моноциклических круглоротых и рыб присутствуют клетки всех периодов – гонии, мейоциты и ооциты периода превителлогенеза разного размера (рис. 7А). Ситуация меняется после того, как в гонадах будет сформирована одна генерация превителлогенных ооцитов сходного размера и состояния (рис. 7Б). Ее формирование у самок всех видов тихоокеанских лососей происходит на первом году жизни, преимущественно в мае-июне при массе около 1,0-1,5 г. Численность этой генерации тесно коррелирует с величиной абсолютной плодовитости. После того, как единственная генерация ооцитов будет сформирована, в яичниках всех рыб наблюдаются два процесса, которые реализуются без очевидной связи друг с другом. Первый процесс – это рост и развитие ооцитов старшей, а, фактически, единственной функциональной генерации. Второй процесс – это продолжающееся размножение гониев и инициирование новых мейотических циклов, которые с формированием первой генерации ооцитов не прекращаются. В

гонадах всех моноциклических самок сохраняются гонии (рис. 7В), они продолжают митотически делиться (рис. 7Г), вступают в мейоз (рис. 7Д) и в состоянии мейоцитов или начала периода превителлогенеза подвергаются резорбции (рис. рис. 7Е).

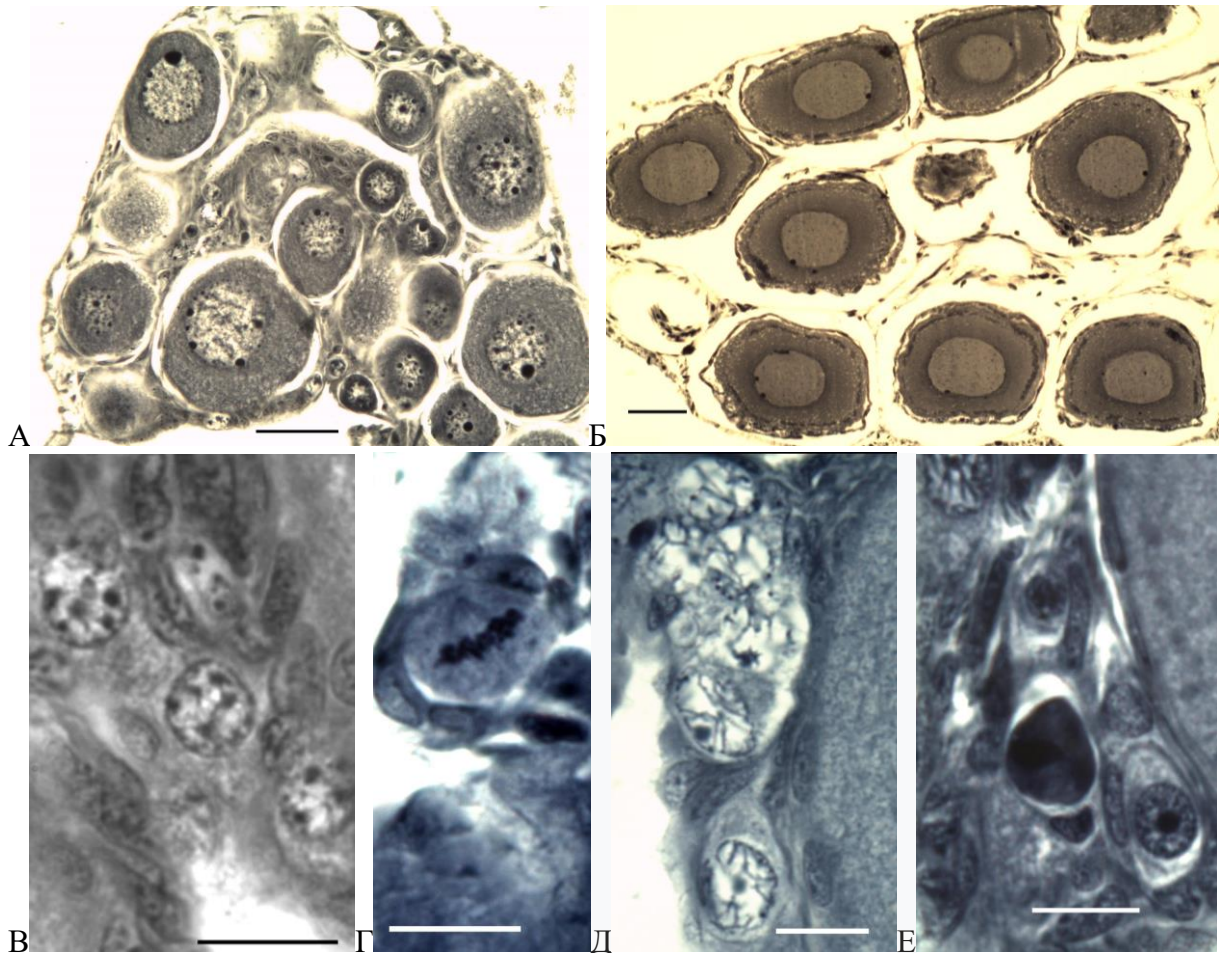


Рис. 7. Состояние гонад у молоди кеты (А, Б), сима (В, Д) и кижуча (Г, Е). Можно видеть ооциты периода превителлогенеза в ходе (А) и после завершения (Б) формирования их единственной генерации: гонии (В) их размножение (Г), мейоциты (Д) и картины резорбции половых клеток (Е). Шкала = 20 мкм.

О том, что вновь появившиеся клетки резорбируются и не пополняют старшую генерацию ооцитов, наиболее убедительно свидетельствует отсутствие в гонадах ооцитов промежуточного размера между ооцитами начала периода превителлогенеза и ооцитами старшей генерации. Этот факт становится все более очевидным по мере роста ооцитов старшей генерации. Полученные данные также свидетельствуют, что процесс размножения гониев с ростом рыб не замедляется, в возрасте 1+ и 2+ идет с такой же интенсивностью, как и у рыб в возрасте 0+ и стимулируется их пребыванием в пресной воде.

По крайней мере, у самого скороспелого вида – горбуши – наиболее рано блокируется размножение гониев, в морской воде гонии и мейоциты практически не встречаются, и старшая генерация ооцитов периода превителлогенеза становится единственной. Однако при выращивании горбуши в лабораторных условиях даже с переходом ооцитов старшей генерации к периоду вителлогенеза (рис. 8А), в гонадах всех рыб можно было по-прежнему видеть многочисленные гонии и мейоциты (рис. 8Б).

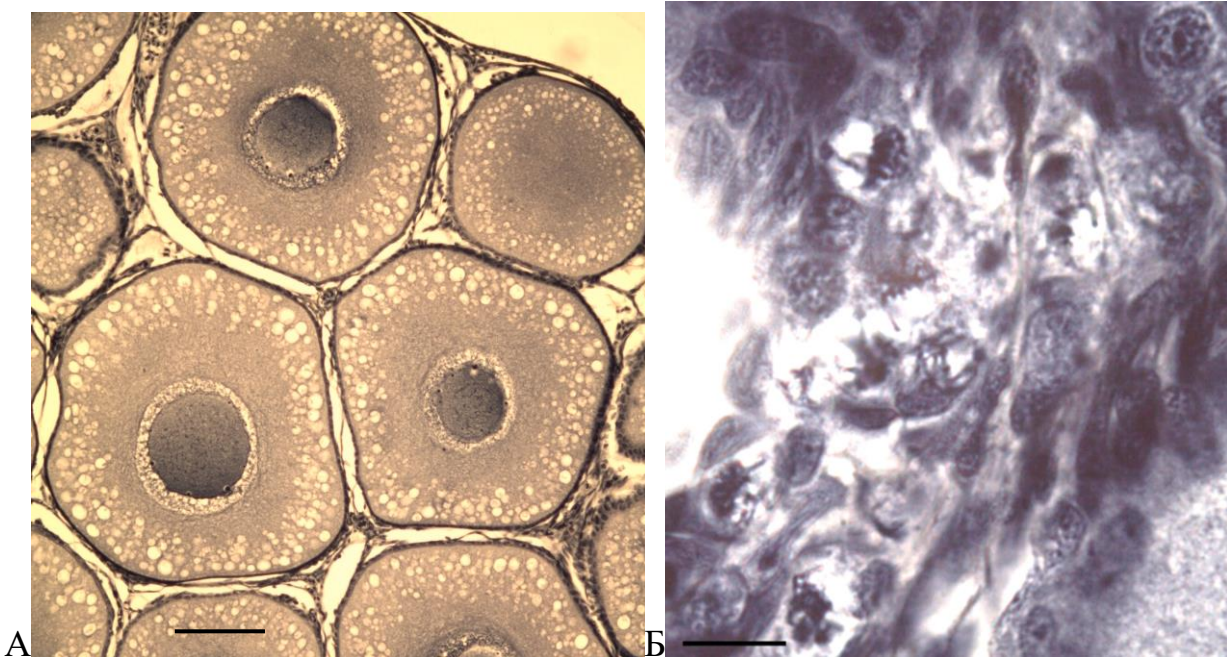


Рис. 8. Половые клетки в гонадах у горбуши, выращенной в лаборатории. Ооциты старшей генерации вступили в период вителлогенеза (А), при этом можно видеть многочисленные гонии и мейоциты (Б). Шкала А = 100, Б = 20 мкм.

Таким образом, вновь отметив, что мейоциты последующих генераций не могут преодолеть барьер начала периода превителлогенеза, исследовали, во-первых, динамику половых стероидных гормонов в ходе формирования единственной генерации ооцитов, во-вторых, возможность предотвратить резорбцию этих ооцитов, оказывая на рыб гормональное воздействие. Установили, что от вылупления и до момента появления в гонадах ооцитов периода превителлогенеза соотношение эстрадиола и тестостерона у молоди кижуча фактически не изменилось, а затем доля эстрадиола начала значительно понижаться до возраста 78 сут, когда формирование старшей генерации ооцитов завершилось, после чего повысилось вновь (рис. 9А). Таким образом,

формирование фонда превителлогенных ооцитов при моноциклии осуществляется на фоне относительного снижения эстрадиола. Задавая этот гормон с кормом, в одной из серий опытов, выполненных на молоди кижуча, смогли предотвратить резорбцию, по крайней мере, части ооцитов начала периода превителлогенеза и добиться достоверного увеличения их фонда у подопытных рыб (рис. 9Б).

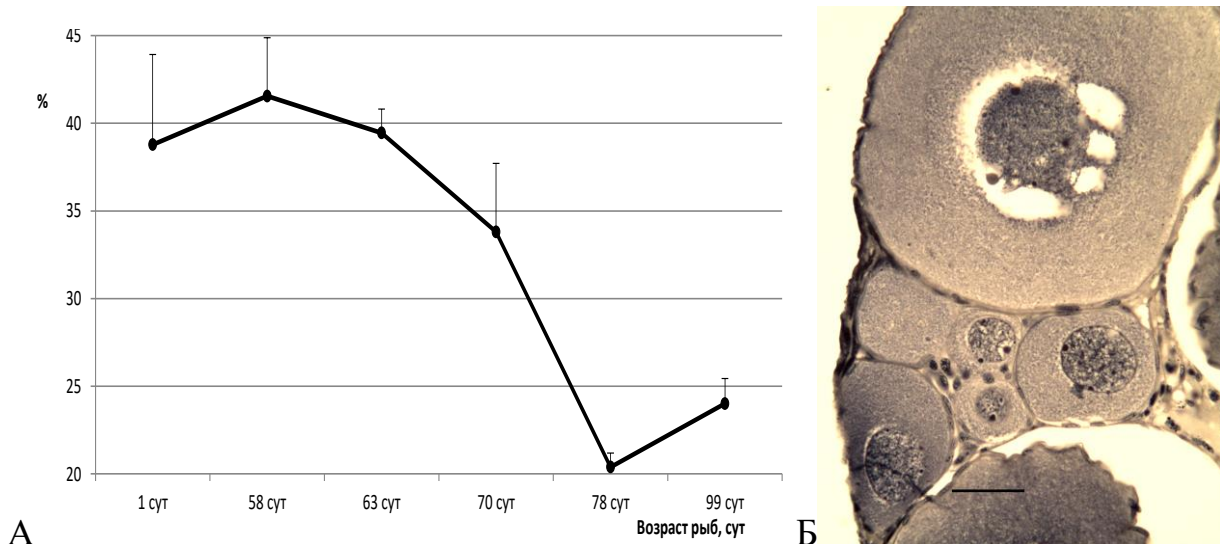


Рис. 9. Соотношение концентрации эстрадиола-17β к тестостерону (%) у молоди кижуча в период дифференцировки пола (А); две генерации ооцитов периода превителлогенеза у самки кижуча после воздействия эстрадиолом (Б). Шкала = 20 мкм.

Глава 4. Влияние различных факторов на формирование фонда половых клеток у молоди рыб

Для исследования влияния внешних факторов на формирование фонда ооцитов у молоди рыб применяли гормональную обработку, а также выдерживание при пониженном рН воды и при пониженной температуре. Воздействие разных факторов на динамику фонда ооцитов у молоди рыб оказалось сходным. Вместе с тем, как непосредственная реакция гонад, так и отдаленные последствия внешнего воздействия на ход развития гонад у подопытных рыб принципиально различались в зависимости от исходного состояния половых клеток.

Так, если кислотное воздействие оказывали на рыб с индифферентным состоянием гонад или в период, когда старшую генерацию половых клеток составляли ооциты периода ранней профазы мейоза, то у подопытных рыб разных

видов – русского осетра, радужной форели или мозамбикской тиляпии – наблюдали увеличение числа половых клеток. У русского осетра увеличению репродуктивного фонда предшествовало усиление функциональной активности в гонадотропной зоне гипофиза и увеличение концентрации тестостерона в крови (Зеленников, 1997). Через 30 сут после окончания кислотного воздействия, продолжавшегося 25 сут, плотность расположения половых клеток, которые в основной массе по прежнему были представлены гониями, мейоцитами и лишь у отдельных рыб единичными ооцитами начала периода превителлогенеза, была такой же, как и у рыб в контроле – $21,3 \pm 1,9$ и $22,6 \pm 0,9$ соответственно. Однако площадь генеративной части на поперечных срезах гонад у подопытных рыб была почти в два раза больше – $17,3 \pm 3,3$ и $9,3 \pm 1,7$, что и указывало на значительное увеличение у них репродуктивного фонда. Отдаленные последствия кислотного воздействия были исследованы у мозамбикской тиляпии, которую в возрасте от 22 до 45 и от 22 до 60 сут выдерживали при повышенной кислотности, а затем вырастили до полового созревания. Как известно, одновозрастные самки мозамбикской тиляпии достигают полового созревания не одновременно и их плодовитость широко варьирует. Однако если у контрольных рыб при прямом подсчете было выявлено $153,3 \pm 10,5$ ооцитов старшей генерации, то у подопытных рыб в опыте 18.2 – $247,5 \pm 35,2$, а в опыте 18.1 – $274,2 \pm 29,8$ ооцита. Таким образом, выдерживание рыб при повышенной кислотности воды в период, когда фонд половых клеток составляли гонии и мейоциты, привело к увеличению численности репродуктивного фонда, а, в конечном итоге, к увеличению величины абсолютной плодовитости.

Увеличение фонда половых клеток наблюдали также после гормональных инъекций эстрадиола в желточный мешок зародышей и личинок во всех проведенных экспериментах. При этом наибольшее увеличение числа ооцитов отметили у рыб, которым была сделана единственная инъекция в период эмбрионального развития (опыт 5.1; рис. 10). Вторая инъекция гормона, сделанная непосредственно после вылупления (опыт 5.2), не усилила эффект от воздействия первой. Наконец, после трех инъекций в возрасте 1, 7 и 14 сут (опыт

5.3) в яичниках у подопытных самок было достоверно меньше ооцитов, чем у рыб в предыдущих опытах. Таким образом, очевидно, что увеличение числа ооцитов в гонадах зависело от состояния гонад в момент обработки, а не от кратности гормонального воздействия или суммарной дозы введенного гормона

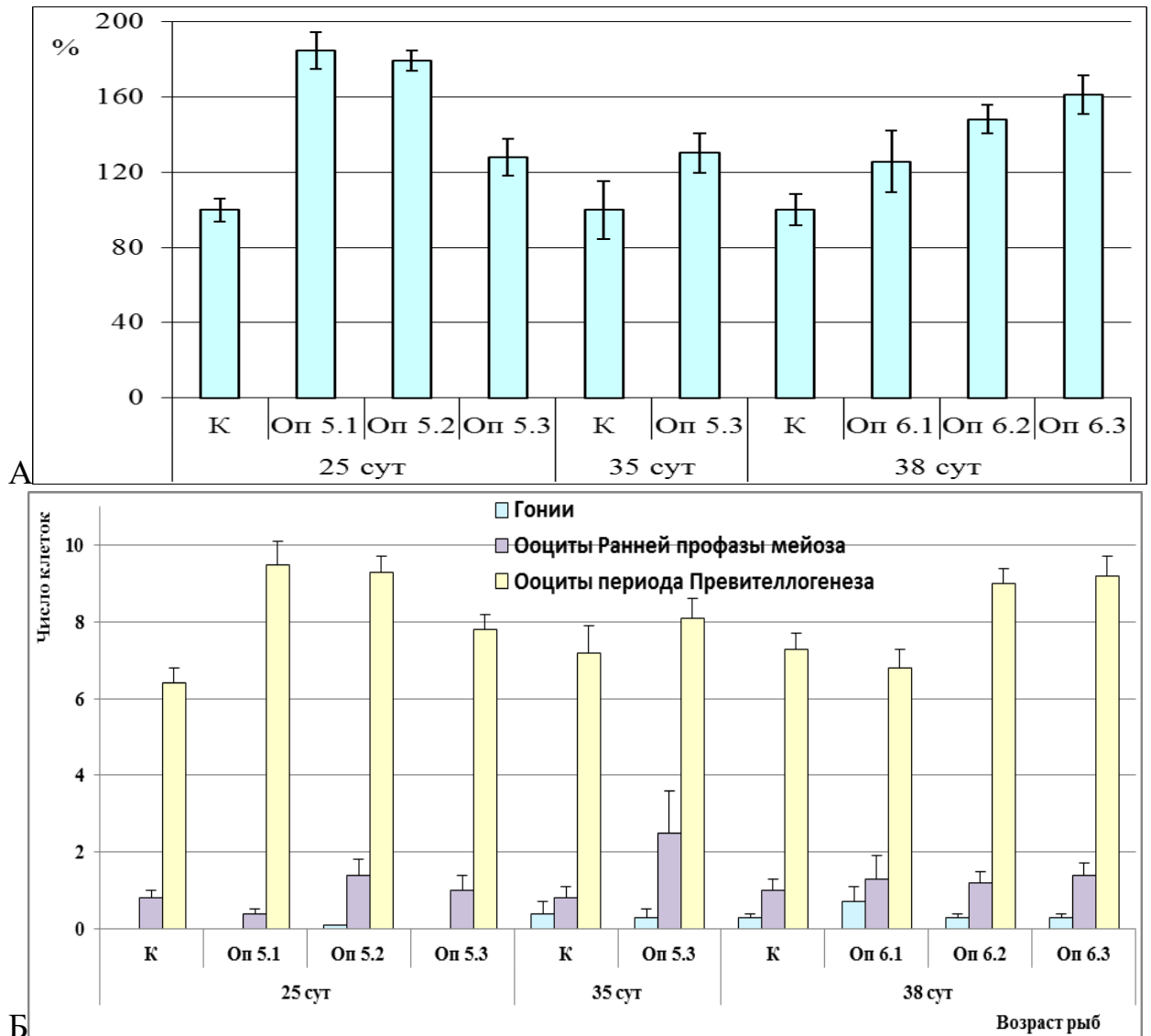


Рис. 10. Площадь поперечных срезов гонад (А; в % от контроля) и число половых клеток у самок горбуши после инъекций эстрадиола в разном возрасте.

Другая ситуация складывалась, если кислотное воздействие распространялось на период формирования фонда ооцитов периода превителлогенеза и захватывало не только начало этого процесса, а формирование старшей генерации в целом. Первоначальное увеличение фонда половых клеток сменилось не только ликвидацией дополнительного числа гониев и мейоцитов, увеличение которых было стимулировано воздействием, но и

уменьшение общего числа половых клеток по сравнению с репродуктивным фондом контрольных рыб.

Так, у молоди радужной форели, выращиваемой в лабораторных условиях при температуре 15-17°C, первые ооциты периода превителлогенеза в гонадах появлялись в возрасте 40 сут. Выдерживая молодь форели при сублетальной кислотности воды в возрасте от 16 до 90 сут, сначала наблюдали значительное увеличение фонда гониев и мейоцитов у подопытных рыб, а затем сокращение репродуктивного фонда, в том числе фонда ооцитов периода превителлогенеза. Сокращение числа превителлогенных ооцитов не было компенсировано до полового созревания подопытных рыб в возрасте 2 года и в конечном итоге привело к уменьшению величины абсолютной плодовитости у них – $2824,8 \pm 147,9$ по сравнению с плодовитостью контрольных самок – $3652,1 \pm 214,9$ (Зеленников, 1997). Такой же итог – уменьшение числа половых клеток, в том числе и ооцитов периода превителлогенеза, наблюдали и у молоди горбуши, которую выдерживали при пониженном рН воды в возрасте от 1 до 63 сут, закончив его значительно позже того момента, когда в яичниках завершилось формирование единственной функциональной генерации ооцитов периода превителлогенеза так, как это характерно для моноциклических лососевых.

Третья ситуация складывается в тех случаях, когда кислотное или гормональное воздействие оказывали на рыб после того, как у них уже был сформирован фонд ооцитов периода превителлогенеза. Так, у молоди горбуши, которую выдерживали при пониженном рН воды в возрасте от 25 до 63 сут, состояние фонда половых клеток в момент окончания эксперимента не отличалось от состояния репродуктивного фонда у контрольных рыб. При этом наблюдали замедление темпа роста подопытных рыб и гибель части из них. Такой же эффект наблюдали и в случае гормонального воздействия на рыб разных видов. И хотя в одной из серий опытов, проведенных на молоди кижуча, удалось, оказывая гормональное воздействие, предотвратить обязательную резорбцию части вновь образующихся ооцитов периода превителлогенеза и стимулировать их развитие, в остальных экспериментах, проведенных на сеголетках горбуши,

кеты, кижуча, сеголетках и двухлетках симы, задавая эстрадиол с кормом, как и ожидалось, удалось стимулировать инверсию пола у самцов, но не удалось каким-либо образом повлиять на развитие фонда ооцитов у самок.

Отдельного анализа заслуживают результаты серии экспериментов, в ходе которых шесть партий молоди кеты в период эмбрионального и личиночного развития при различном состоянии гонад, на 14 сут переводили из воды с температурой 9,9-12,0°C в воду с температурой 1,3-1,8°C. Пониженная температура воды во всех случаях привела к снижению темпа роста у подопытных рыб, наиболее очевидному в тех вариантах, когда молодь выдерживали при пониженной температуре на завершающем этапе личиночного развития. Дефицит массы тела, возникший при пониженной температуре, в дальнейшем не был компенсирован при содержании контрольных и подопытных рыб в одинаковых условиях. Одновременно с массой тела у подопытных рыб произошло уменьшение массы яичников. Однако относительное уменьшение массы половых желез произошло исключительно за счет клеток стромы, т.е. их соматической части, не затронув в среднесрочной перспективе фонд половых клеток. Число ооцитов и их размеры, а также соотношение ооцитов разных периодов развития, у подопытных и контрольных рыб не различались уже через 50 сут после завершения воздействия в последнем варианте (табл. 2).

Таблица 2.

Состояние яичников у молоди кеты в возрасте 112 сут после содержания при пониженной температуре в разном возрасте

Вариант	Число рыб, экз.	Масса рыб, г	Масса гонад, мг	Площадь среза гонад, $\times 10^{-3}$ мм ²	ооцитов периода превителлогенеза	Диаметр ооцитов, мкм
Контроль	26	3,16±0,17	6,1±0,22	231,6±11,8	11,8±0,52	106,9±1,8
Опыт 21.1	10	2,60±0,26	5,3±0,40	198,0±12,4	12,7±1,06	108,6±2,2
Опыт 21.2	19	2,24±0,14*	5,6±0,24	226,8±18,1	13,9±0,92*	111,8±1,7
Опыт 21.3	9	1,94±0,12*	4,6±0,2*	158,4±11,9*	11,9±1,26	110,4±2,3
Опыт 21.4	19	1,93±0,09*	3,9±0,18*	156,0±9,0*	13,5±0,75	100,6±2,4*
Опыт 21.5	18	1,98±0,15*	4,3±0,31*	158,4±31,6*	11,9±0,54	107,2±2,6
Опыт 21.6	19	2,02±0,15*	4,2±0,23*	158,4±10,1*	11,2±0,65	101,6±2,3

– различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Таким образом, проведенное сравнительно кратковременное воздействие не влияет на развитие фонда ооцитов у молоди при любом исходном состоянии

гонад, даже если приведет к замедлению темпа роста подопытных рыб, что, вероятно, является подтверждением тезиса о надежности развития воспроизводительной системы (Персов, 1975).

Глава 5. Анализ связи между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей у лососей с коротким периодом жизни в реке

Тихоокеанский лосось – кета, является основным объектом искусственного воспроизводства в Сахалинской области и на Дальнем Востоке России в целом. При этом даже в пределах Сахалинской области качественно различаются как условия воспроизводства молоди этого вида на разных предприятиях, главным образом, в зависимости от объема использования грунтовых вод, так и возрастная структура в заводских стадах. Полагая, что условия воспроизводства прямо влияют на возраст полового созревания производителей кеты, мы исследовали развитие ее молоди в течение полного рыбоводного цикла при трех наиболее различных температурных режимах на Ясноморском, Соколовском и Побединском ЛРЗ, а также при постоянной температуре 10-12°С в лабораторных условиях.

У молоди кеты при любом режиме выращивания цитологическая дифференцировка пола осуществляется после вылупления. Начало периода ранней профазы мейоза в развитии ооцитов старшей генерации тесно связано с температурой при выращивании рыб, осуществляется при сходной сумме набранных градусо-дней – от 620,6 до 669,1, но в весьма различном календарном возрасте – от 6 сут при стабильной и наиболее высокой температуре в лаборатории до 128 сут у последних партий на самом холодноводном Ясноморском ЛРЗ. Продолжительность этого периода может быть разной как в отношении календарного возраста, так и по сумме набранного молодью тепла, но всегда завершается в период личиночного развития; при любом температурном режиме превителлогенный рост ооцитов начинается либо незадолго до-, либо непосредственно в период начала кормления рыб, но всегда в момент, когда у рыб

еще присутствует остаток желточного мешка – в среднем от 1,8 до 18,2% от общей массы тела.

На следующем этапе исследовали состояние гонад у молоди при ее выпуске с 11 рыбобудных заводов, для которых известна возрастная структура стада и где технически возможно проследить развитие каждой партии отдельно. Молодь кеты за период выращивания на заводах Сахалинской области набирала разную сумму градусо-дней – от 1002,7 на Калининском до 1761,7 на Охотском, но перед выпуском имела сходную массу тела. Этот эффект объясняется тем, что на холодноводных в течение полного года заводах самая высокая температура воды устанавливается в конце мая-июне и совпадает с периодом наиболее интенсивного роста мальков (Коломыцев, 2018). Вместе с тем, состояние гонад при сходной массе тела перед выпуском с различных предприятий принципиально различалось, и было тесно связано с суммой градусо-дней (рис. 11). Так, по мере увеличения суммы градусо-дней, у молоди кеты прогрессивно увеличивался диаметр ооцитов ($r=0,84$; рис. 12), площадь яичников на поперечных срезах ($r=0,73$) и, напротив, уменьшалась доля гониев и мейоцитов ($r=-0,86$). При этом следует отдельно подчеркнуть, что в пределах каждой из 24 выборок молоди, исследованных нами в период с 2000 по 2019 г., не было выявлено зависимости между массой рыб и диаметром ооцитов, а также размерами яичников, что наглядно можно видеть на микрофотографиях (рис. 11).

В качестве «контроля» при исследовании молоди кеты анализировали состояние гонад у молоди горбуши, полагая, что при одновременном созревании рыб каждого поколения состояние яичников у особей одного возраста будет более сходным. При этом состояние гонад исследовали у рыб на всех 22 заводах, на которых в годы нашей работы молодь горбуши выращивали в Сахалинской области. Как и у молоди кеты, у молоди горбуши перед выпуском с рыбобудных заводов, по мере увеличения суммы градусо-дней, закономерно увеличивались площадь гонад на срезах ($r=0,80$) и диаметр ооцитов ($r=0,84$); при этом оба этих показателя в пределах каждой из обследованных партий не были связаны с темпом роста рыб. Отсутствие этой связи было проверено в том числе и на

выборке большого объема ($n=88$). Степень вариабельности интересующих нас показателей у молоди кеты перед выпуском действительно оказалась выше, чем у молоди горбуши. Например, на Сокольниковском ЛРЗ при сумме 1139,8 градусо-дней диаметр ооцитов в среднем составил 32,9 мкм. При этом дисперсия массы тела была 258, площади гонад на срезах – 368, а диаметра ооцитов – 130. На Охотском ЛРЗ при сумме 1884,5 градусо-дней диаметр ооцитов был в три раза больше – 94,5 мкм, а показатели дисперсии – 232,5; 433,7 и 41,5 соответственно. У молоди горбуши, которую в экспериментальном режиме на Кетовом ЛРЗ вырастили до навески 910,7 мг диаметр ооцитов в среднем составил 119,7 мкм. Дисперсия массы тела у горбуши в обследованной группе – 282 была больше, а дисперсия площади гонад на поперечных срезах – 257, и диаметра ооцитов – 23 значительно меньше, чем у молоди кеты обеих партий.

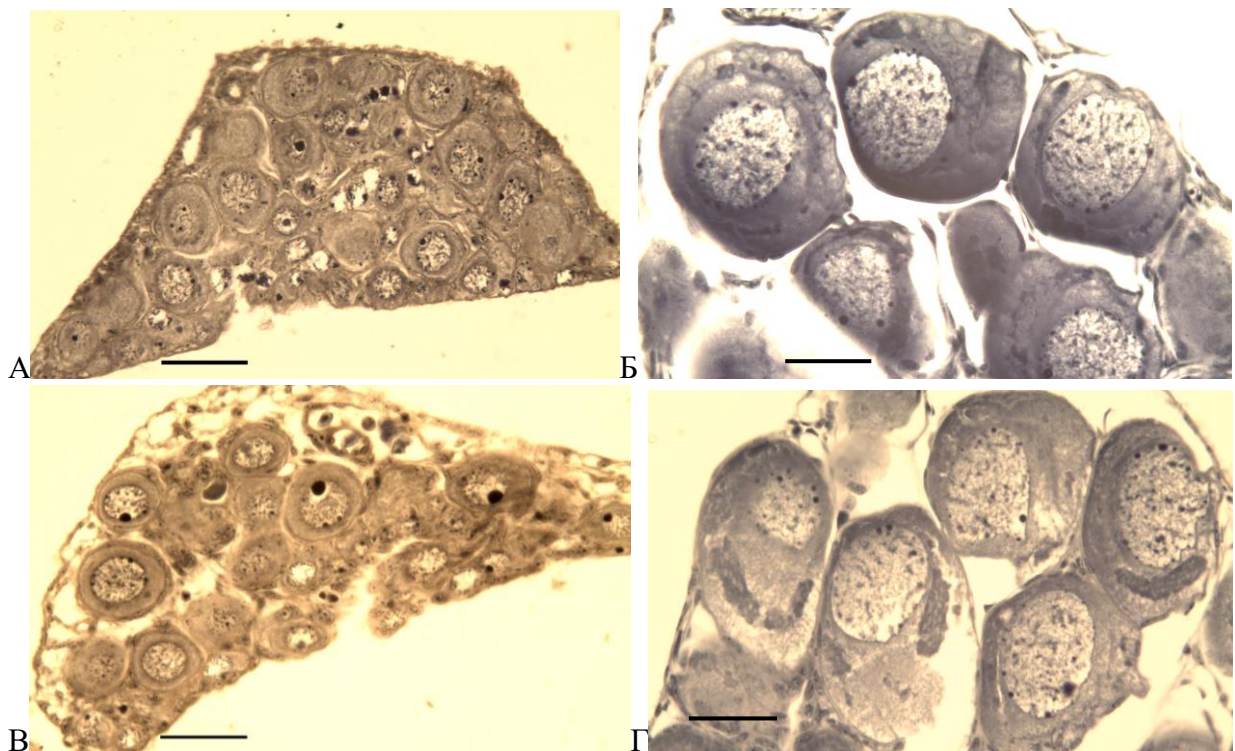


Рис. 11. Состояние яичников у кеты при выпуске с Сокольниковского ЛРЗ массой 614 (А) и 1304 мг (В), с Охотского ЛРЗ массой 640 (Б) и 1210 мг (Г), представленных при одном увеличении. Шкала = 50 мкм.

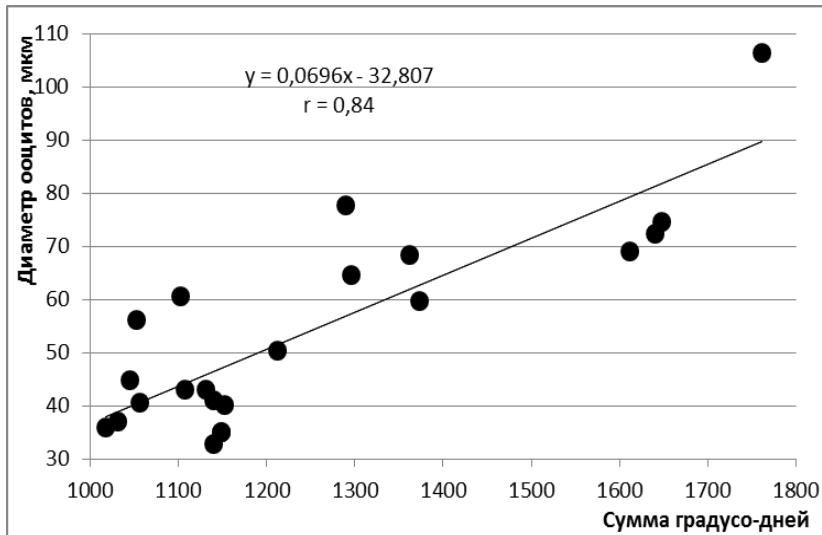


Рис. 12. Зависимость между диаметром ооцитов старшей генерации и суммой градусо-дней у молоди кеты перед выпуском с рыбоводных заводов.

Вместе с тем, наиболее информативным оказалось обследование природной молоди кеты в период катадромной миграции. В отличие от заводской молоди кеты и горбуши, а также природной молоди горбуши, у единовременно пойманных самок кеты два главных показателя состояния гонад – площадь поперечных срезов яичников и диаметр ооцитов – тесно и положительно коррелировали с массой (коэффициенты корреляции 0,81 и 0,76 соответственно) и длиной самок (0,66 и 0,68). Это свидетельствует о том, что выборки одновременно пойманных мальков кеты составили не только разноразмерные, но, главным образом разновозрастные особи.

Глава 6. Анализ связи между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей у лососевых рыб

В течение полного периода полового созревания исследовали радужную форель, выращенную в лабораторных условиях при температуре 15-17°C в течение 21 мес. и при температуре 19-20°C в течение 22 мес., а также выращенных в условиях ФСГЦР «Ропша» кумжу каспийской популяции в течение 51,5 мес. и атлантического лосося онежской популяции в течение 53,5 мес.

У радужной форели при постоянной температуре 15-17°C, цитологическую дифференцировку пола выявили в возрасте 25 сут, а ооциты периода превителлогенеза – в возрасте 40 сут. Период превителлогенного роста ооцитов

продолжался ориентировочно до возраста 10 мес., а половое созревание всех самок (за единственным исключением) в среднем произошло в возрасте 21 мес.

У самок форели при постоянной температуре 19-20°C состояние репродуктивной системы было иным. Первые ооциты начала периода превителлогенеза отметили в возрасте 2,5, а ооциты периода вителлогенеза – в возрасте 12 мес. При этом в период превителлогенного роста произошло разделение подопытной группы на особей с разным темпом оогенеза. В результате самки форели также достигали полового созревания в среднем в возрасте около 21 мес., но только 31,0% от общего числа рыб. У остальных самок к этому возрасту старшую генерацию ооцитов по прежнему составляли ооциты периода превителлогенеза.

Такие же отличия наблюдали у самок каспийской кумжи и атлантического лосося онежской популяции. Так, у кумжи начало периода вителлогенеза было выявлено через 21,5 мес. после вылупления, а половое созревание всех самок произошло еще через 24 мес. У самок лосося период вителлогенеза начался значительно позже – в возрасте 41,5 мес., а половое созревание спустя всего 12 мес., но наблюдали его у 76,5% рыб.

Таким образом, при одновременном созревании самок период вителлогенеза оказывается более длительным, чем период превителлогенеза. При половом созревании части особей продолжительность периода вителлогенеза у них сокращалась. Половое созревание самцов у всех видов опережало половое созревание самок.

Глава 7. К вопросу о резорбции ооцитов периода превителлогенеза в раннем онтогенезе круглоротых и рыб

В гонадах самок исследованных видов рыб наблюдается резорбция единичных ооцитов периода превителлогенеза, которые отличаются пикноморфным уплотнением цитоплазмы и интенсивной окраской в процессе гистологической обработки (рис. 13А). Внешнее экспериментальное воздействие на рыб не приводит к увеличению резорбции ооцитов даже в тех случаях, когда наблюдается остановка роста и массовая гибель подопытных рыб. Внешнее

воздействие и связанный с ним энергетический дефицит лишь ускоряет резорбцию изначально нежизнеспособных ооцитов. При этом практически у всех рыб, исследованных как в лаборатории, так и выловленных в естественной среде, наблюдали сжатие ооцитов, как правило, достигших определенного размера и потерю ими обычной эллипсоидной формы (рис. 13Б). В ходе исследования рыб одних и тех же партий в течение длительного времени (до 2 лет и более) было установлено, что сжатие ооцитов является артефактом фиксации и последующей гистологической обработки.

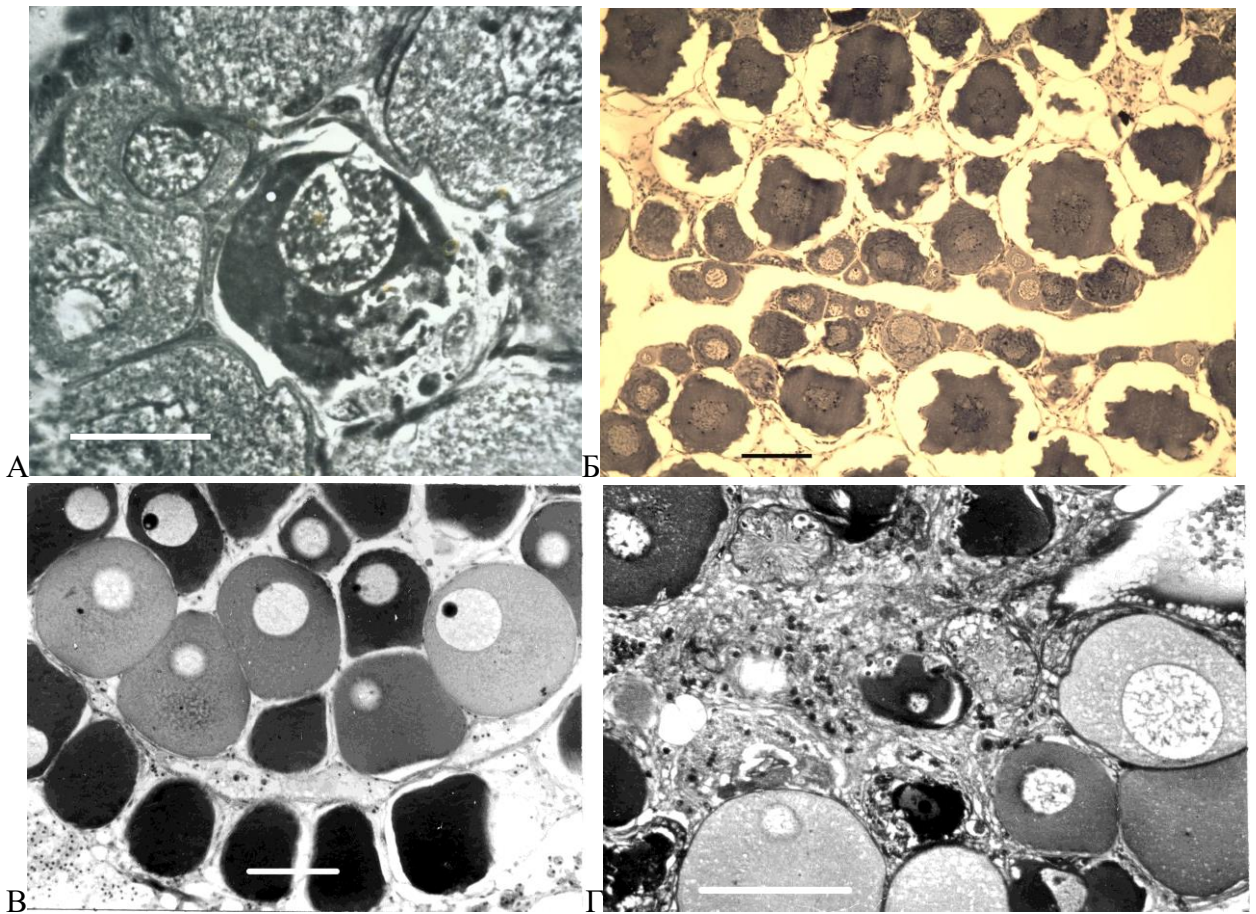


Рис. 13. Резорбция ооцита периода превителлогенеза (А) и их сжатие в процессе гистологической обработки (Б); внешний вид гонады до начала (В) и в процессе (Г) массовой резорбции ооцитов у личинок ручьевой миноги. Пояснение в тексте. Шкала = 50 мкм.

Массовая резорбция ооцитов периода превителлогенеза, которую в работе изучили у личинок ручьевой миноги, осуществляется лишь в двух случаях: как начальный этап формирования величины абсолютной плодовитости у видов, произошедших в эволюции от более крупных и более плодовитых предковых

форм, и как механизм «самоуничтожения» (Сакун, 1985) у некоторых видов с циклической динамикой численности.

Глава 8. Влияние раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у круглоротых и рыб (Общее заключение)

Приступая к работе с молодью горбуши, мы обладали значительной информацией о гаметогенезе этого вида, изученного детальнее, чем у остальных тихоокеанских лососей. Однако на данный момент мы не можем судить, насколько у горбуши необратимо predetermined феминизация будущих семенников в период эмбрионального развития. По крайней мере, применяя даже максимально большие дозы экзогенного тестостерона, мы не смогли предотвратить этот процесс. Вместе с тем известно, что еще задолго до феминизации будущих семенников predetermined их последующая инверсия (Персов, 1966). Проследивая последовательно развитие будущих самок и самцов, мы установили, что в момент вылупления их гонады по размерам и составу половых клеток не различаются. Затем постепенно начинают выявляться две группы особей. У одних продолжает увеличиваться число половых клеток, у других этот процесс идет с явно замедленным темпом. Складывается ощущение, что формирование гонад у будущих самцов осуществляется при конкурентном взаимодействии мужского и женского начал. Гонады именно таких особей – с замедленным темпом формирования фонда ооцитов – вступают на путь инверсии.

Следует особо подчеркнуть, что резорбция гониев и мейоцитов не является признаком инверсии пола и, соответственно, признаком будущих семенников. Более того, в яичниках у самок резорбция клеток проходит более интенсивно, а сам процесс оказывается более масштабным. Связано это с тем, что к моменту интенсивной резорбции число половых клеток у самок оказывается в несколько раз больше, чем у будущих самцов. Единственным признаком развития гонад у последних является постепенное замедление темпа размножения гониев и, соответственно, пополнения фонда ооцитов.

Развитие немногочисленных ооцитов в будущих семенниках продолжается и в период инверсии, а завершается этот процесс не раньше, чем в гонадах будущих самцов горбуши и других видов протогинических гермафродитов появятся ооциты периода превителлогенеза. Однако в оболочках ооцитов у будущих самцов, в отличие от половых клеток самок, не формируются стероидсекреторные клетки. Таким образом, представляется очевидным, что полноценный переход ооцитов к фазе роста или, в трактовке Равена (Равен, 1964), от генеративной к вегетативной фазе оогенеза, оказывается невозможным.

Вместе с тем, судьба ооцитов в гонадах генотипических самцов онтогенетически оказывается предрешенной и их развитие завершится резорбцией. Однако цитологически эти клетки являются живыми и потенциально жизнеспособными. Делая инъекцию эстрадиола зародышам и личинкам горбуши, мы предотвращали резорбцию ооцитов, а их дальнейшее развитие не отличалось от развития ооцитов у генотипических самок. При этом гормональное воздействие останавливало ход инверсии пола на том этапе, на каком его заставляло, и, чем раньше оказывали воздействие, тем меньше гонады у генотипических самцов и самок отличались друг от друга по составу половых клеток.

У самок всех остальных видов тихоокеанских лососей также наблюдается значительное производство «лишних» половых клеток, которые будут подвергнуты тотальной резорбции. Так, у самок кеты формирование фонда ооцитов осуществляется с такой же асинхронностью, как и у самок горбуши. Разница заключается лишь в том, что у кеты и остальных видов с более длительным периодом полового созревания период раннего гаметогенеза оказывается более замедленным и поэтому более заметным. Однако со временем у самок всех видов формирование фонда превителлогенных ооцитов завершается, а его пополнение прекращается. Полученные данные позволяют утверждать, что это происходит уже на первом году жизни – у мальков кеты, симы, нерки, кижуча и чавычи при массе около 1 г, а их число соответствует величине абсолютной плодовитости. В дальнейшем клетки этого фонда развиваются либо синхронно,

либо с заметной асинхронностью, предположительно, в прямой зависимости от продолжительности полового созревания.

После формирования единственной функциональной генерации ооцитов процесс размножения гониев не прекращается и не ослабевает. Гонии продолжают размножаться, вступают в мейоз, часть из них – в период превителлогенеза и на всех этих этапах половые клетки в массе подвергаются резорбции. Реализуется невозможность развития этих половых клеток, очевидно, посредством гормонального дефицита, но регулируется на генетическом уровне. О первом свидетельствует возможность преодолеть неизбежную резорбцию ооцитов начала превителлогенеза, оказывая на рыб гормональное воздействие. Причем, как на зародышей, делая им инъекцию эстрадиола в желточный мешок, так и на молодь, задавая ей гормон с кормом. О втором свидетельствуют многочисленные данные литературы. Так, у гиногенетических и гибридных форм сиговых рыб наблюдается задержка или неспособность ооцитов перейти из периода ранней профазы мейоза в период превителлогенеза (Богданова, 1991).

Сопоставляя состояние гонад у моноциклических и полициклических лососевых, мы приходим к заключению, что с учетом массового перепроизводства половых клеток у первых развитие гонад у тех и других в онтогенезе различается не столь существенно, как это предполагали до начала работы. На первом этапе у моноциклических и полициклических рыб происходит формирование генерации ооцитов периода превителлогенеза. Но затем у полициклических рыб мейоциты группами продолжают вступать в период превителлогенеза, обеспечивая волновой характер постоянного пополнения их фонда. У моноциклических рыб с определенного момента наблюдается тотальная элиминация ооцитов ранних состояний. У молоди горбуши, казалось бы, процесс размножения гониев после выхода рыб в прибрежье завершился, что, тем не менее, является не онтогенетической закономерностью, а процессом, контролируемым условиями нагула. При исключении морского периода в развитии размножение гониев не прекращалось и, предположительно, не замедлялось вплоть до начала периода вителлогенеза.

Для полициклических рыб перепроизводство половых клеток является столь же характерным, но выявить его удастся, поместив рыб в экстремальные условия, в частности, в воду повышенной кислотности. При этом если экспериментальное воздействие прекращали до того, как начинался превителлогенный рост ооцитов, то впоследствии у подопытных рыб наблюдали увеличение фонда половых клеток. Если же начало превителлогенного роста ооцитов совпадало с продолжением токсического воздействия, наблюдали не только ликвидацию избыточного числа ооцитов, но и сокращение фонда половых клеток у подопытных рыб по сравнению с контрольными. При этом сокращение числа ооцитов периода превителлогенеза у подопытных рыб не компенсировалось, и впоследствии приводило к сокращению величины абсолютной плодовитости.

Если токсическое воздействие на рыб начинали после того, как в гонадах уже была сформирована генерация половых клеток периода превителлогенеза, то не наблюдали ни увеличения ее численности, что представляется естественным, ни сокращения, которого ожидали, руководствуясь данными литературы. Однако за все годы исследования ооцитов периода превителлогенеза у рыб в естественных условиях обитания и при заводском выращивании, в экспериментах с применением гибридизации рыб и с использованием пониженной температуры, гормонального или токсического воздействия, а также при выращивании рыб разных видов до полового созревания, выявить массовую резорбцию этих клеток не удалось, даже в случаях остановки роста подопытных рыб и гибели части из них. За массовой резорбцией ооцитов периода превителлогенеза проследили лишь у личинок ручьевой миноги при реализации известного механизма сокращения величины потенциальной плодовитости до величины абсолютной плодовитости (Hardisty, 1964; Hughes, Potter, 1969).

Анализируя темп роста ооцитов, мы установили, что условия воспроизводства молоди горбуши и кеты в Сахалинской области значительно различаются, о чем в первую очередь можно судить по температурным графикам. Главным итогом исследования природной и заводской молоди горбуши и кеты стали выраженные различия в состоянии яичников у молоди кеты перед выпуском

с разных предприятий, более существенные, чем у созревающей в один год молоди горбуши. Важным стал и известный в научной литературе факт одновременной катадромной миграции одновозрастной молоди кеты (Kaeriyama, 1997), но показанный нами с позиции состояния яичников.

По совокупности всех полученных данных применительно к возрасту полового созревания кеты можно рассмотреть следующий ход событий. Изначально у молоди кеты в конкретной реке (на рыбноводном заводе) устанавливается определенный темп гаметогенеза, регулируемый условиями, в которых проходит ее развитие, в первую очередь температурным режимом. В дальнейшем, темп гаметогенеза остается высоким либо более длительное время, если молодь летом (при относительно высокой температуре) совершает продолжительную миграцию в прибрежье, либо менее длительное время, если молодь относительно рано выходит в морскую среду. Уже в период морской миграции у разных особей генерации каждого года устанавливается определенная дифференциация в состоянии гонад, соответствующая таковой у лососей с длительным речным периодом (Иевлева, 1985; Мурза, Христофоров, 1991). Эта дифференциация, являющаяся отражением разного темпа оогенеза, в дальнейшем и приведет к половому созреванию в разном возрасте. Представляется вероятным, что чем более комфортными были условия для содержания рыб, особенно в период, когда в яичниках начинается развитие ооцитов периода превителлогенеза, тем большее число особей достигнет половой зрелости в молодом возрасте (3+ и ранее). Можно создать наиболее благоприятные условия и добиться полового созревания всех особей каждого поколения одновременно и в возрасте 2+. Это наглядно было продемонстрировано именно для кеты после ее интродукции в бассейн Каспийского моря (Магомедов, 1970).

На наш взгляд, наиболее убедительно в пользу гипотезы о влиянии темпа роста ооцитов на темп полового созревания производителей кеты, свидетельствуют данные, полученные при выращивании радужной форели, рядом авторов относимого к этому же роду *Oncorhynchus* (Smith, Stearley, 1989). Как и у кеты, производители форели одного поколения достигают полового созревания в

течение нескольких лет. Мы, создавая, максимально комфортные температурные условия, добились полового созревания всех особей одновременно и, полагаем, в максимально короткий срок. Этот факт позволяет нам отметить два обстоятельства. Во-первых, очевидно, что одновременное половое созревание всех самок радужной форели, так же, как и всех самок кеты в бассейне Каспийского моря, произошло под влиянием условий выращивания. Во-вторых, представляется очевидной роль превителлогенного роста ооцитов в достижении одновременного полового созревания, потому что именно в период превителлогенеза и происходит разделение группы ровесников на особей, созревающих в разном возрасте.

По совокупности данных, полученных при выращивании лососевых рыб в течение полного периода полового созревания, а также данных, имеющих в литературе (Мурза, Христофоров, 2010; и др.), обозначилась следующая закономерность. У лососей с одновременным половым созреванием период от вылупления зародышей до завершения превителлогенного роста ооцитов всегда короче, чем от начала периода вителлогенеза до полового созревания. Здесь отметим, что период вителлогенеза в данной трактовке (Чмилевский, 2017) начинается с вакуолизации цитоплазмы. В противоположность этому, если период вителлогенеза оказывается короче превителлогенеза, то полового созревания в первый год для данного поколения достигает только часть особей (Селюков, 2012 и др.).

ВЫВОДЫ

1. Феминизация гонад у самцов круглоротых и рыб – ювенильных протогинических гермафродитов – является видоспецифичной и осуществляется на разных этапах онтогенеза – в период эмбрионального, личиночного или малькового развития. При этом естественная инверсия пола у самцов всех видов завершается не ранее появления в их гонадах превителлогенных ооцитов.

2. У генотипических самцов гормональный статус не предусматривает полноценного перехода клеток к превителлогенезу, однако потенциально ооциты являются жизнеспособными и применение экзогенного эстрадиола предотвращает

их резорбцию; вследствие этого, процесс естественной инверсии пола может быть остановлен на любом этапе его реализации. Со временем различия в состоянии гонад у таких самцов и интактных самок нивелируются, и у всех особей происходит развитие обычных яичников.

3. Формирование фонда ооцитов при поли- и моноциклической стратегии развития в раннем онтогенезе круглоротых и рыб оказывается принципиально сходным. При полициклии мейоциты переходят в период превителлогенеза группами, определяя волновой характер формирования фонда ооцитов. У моноциклических круглоротых и рыб в раннем онтогенезе неизменно осуществляется формирование избыточной генерации половых клеток начальных этапов развития – гониев и ооцитов периода ранней профазы мейоза. После перехода к превителлогенезу определенного числа мейоцитов формируется единственная генерация ооцитов этого периода, численность которой тесно коррелирует на популяционном и видовом уровне с величиной абсолютной плодовитости у производителей.

4. У моноциклических лососевых после формирования единственной генерации ооцитов периода превителлогенеза продолжается размножение гониев и инициирование новых мейотических циклов, которое стимулируется пребыванием рыб в пресной воде и до совершения катадромной миграции не ослабевает. Половые клетки, не вошедшие в единственную генерацию ооцитов на этапах ранней профазы мейоза и начала превителлогенеза, подвергаются тотальной резорбции, предотвратить которую можно внешним эстрогенным воздействием.

5. Выращивание полициклических рыб в непривычных для вида условиях, а также при гормональном или умеренно токсическом воздействии может вести к формированию избыточной генерации половых клеток. Дальнейшая их судьба определяется при вступлении в период превителлогенеза. Если до его начала экстремальная нагрузка прекращается, увеличение числа мейоцитов сопровождается увеличением числа превителлогенных ооцитов, а в дальнейшем – увеличением величины абсолютной плодовитости; при сохранении воздействия

происходит ликвидация избыточного и сокращение исходного числа половых клеток, что в конечном итоге ведет к сокращению величины абсолютной плодовитости.

6. Умеренное токсическое, температурное или гормональное воздействие на рыб после формирования в яичниках фонда ооцитов периода превителлогенеза не приводит к изменению числа половых клеток даже в случае заметного снижения темпа роста подопытных рыб; ооциты начала превителлогенеза у молоди рыб устойчивы к сублетальному токсическому воздействию и не подвергаются резорбции при концентрациях, летальных для большей части особей.

7. Темп оогенеза у молоди кеты в зависимости от условий воспроизводства существенно различается, но при любом температурном режиме дифференцировка пола начинается после вылупления зародышей, а превителлогенный рост ооцитов на этапе личиночного развития – при сохранении у рыб остатка желточного мешка.

8. Перед выпуском с рыбоводных предприятий состояние гонад у мальков кеты не зависит от массы рыб, но тесно связано с суммой накопленных за период выращивания градусо-дней. При этом на тех заводах Сахалина, на которых среди производителей преобладают особи старших возрастных групп – 4+, 5+, 6+, выпускают мальков с наименее развитыми яичниками, и напротив, более развитые гонады характерны для мальков на заводах, где основу промыслового стада составляют молодые особи – в возрасте 2+ и 3+. Диаметр ооцитов и уровень развития половых желез у молоди кеты варьирует в более широком диапазоне, чем у молоди горбуши, что является первым шагом выявления среди одновозрастных мальков особей с разным темпом оогенеза.

9. Для каждого вида лососевых рыб путем подбора температурного режима возможно создание максимально комфортных условий, при которых производители, достигающие в природе полового созревания в течение нескольких лет, созреют одновременно.

10. Разделение генерации одновозрастных самок на особей, созревающих в разные годы, приходится на период превителлогенеза. При одновременном

половом созревании продолжительность периода вителлогенеза у всех рыб превышает длительность превителлогенеза. При созревании в разные годы первыми достигают зрелости особи, вителлогенез у которых проходит в более сжатые сроки, чем период превителлогенеза.

Основные публикации по теме диссертации

Публикации в изданиях Web of science, Scopus

1. Zelennikov O.V., Mosyagina M.V., Fedorov K.E. Oogenesis inhibition, plasma steroid levels, and morphometric changes in the hypophysis in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) exposed to low environmental pH // *Aquatic Toxicology*. 1999. V. 46. № 1. P. 33-42.
2. Мосягина М.В., Зеленников О.В. О роли стероидсекреторных клеток в регуляции развития гонад у молоди тихоокеанских лососей // *Вопросы ихтиологии*. 2006. Т. 46. № 2. С. 272-277.
3. Зеленников О.В., Сабанова Е.В., Мищенко О.В. Влияние закисления воды на оогенез горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum // *Вопросы ихтиологии*. 2007. Т. 47. № 2. С. 269-272.
4. Мосягина М.В., Зеленников О.В. Состояние стероидсекреторных клеток и концентрация половых стероидных гормонов в плазме крови сибирского осетра *Acipenser baerii* и стерляди *A. rutenus* (Acipenseridae) в период дифференцировки пола // *Вопросы ихтиологии*. 2016. Т. 56. № 1. С. 95-101.
5. Зеленников О.В., Погодин В.П., Отставная Е.Г. Распределение молоди тихоокеанских лососей и сопутствующих видов рыб в озере Сопочное (остров Итуруп) // *Биология моря*. 2016. Т. 42. № 2. С. 153-155.
6. Коломыщев В.С., Лапшина А.Е., Зеленников О.В. Состояние яичников у молоди кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) осенней и летней рас при ее выращивании на рыбоводных заводах Сахалинской области // *Биология моря*. 2018. Т. 44. № 1. С. 36-40.
7. Зеленников О.В., Голод В.М. Гаметогенез радужной форели *Parasalmo mykiss*, выращенной от вылупления до полового созревания при температуре около 20°C // *Вопросы ихтиологии*. 2019. Т. 59. № 1. С. 68-79.

8. Зеленников О.В., Юрчак М.И. Гаметогенез тихоокеанских лососей. 1. Состояние гонад у молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum, при ее естественном и заводском воспроизводстве в Сахалинской области // Вопросы ихтиологии. 2019. Т. 59. № 6. С. 741-744.

9. Tashbaev D., Mosyagina M., Lukina J., Pechenkina A., Anipchenko P., Garlov P. Zelennikov O. Comparative analysis of state of the neurosecretory system of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* walb. on different stages of ontogenesis // Journal of Animal Science, 2019. V. 97. № 53. P. 369–370.

10. Зеленников О.В., Проскуряков К.А., Рудакова Г.С., Мякишев М.С. Сравнительная характеристика молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum, при ее естественном и заводском воспроизводстве в Сахалинской области // Биология моря. 2020. Т. 46. № 1. С. 14-23.

11. Мякишев М.С., Иванова М.А., Зеленников О.В. К вопросу о мечении молоди лососей и эффективности работы рыбоводных заводов // Биология моря. 2019. Т. 45. № 5. С. 342-348.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

12. Зеленников О.В. Гаметогенез радужной форели *Onchorynchus mykiss*, выращенной в системе с оборотным водоснабжением от вылупления до полового созревания при оптимальной температуре // Вопросы ихтиологии. 1999. Т.39. №1. С. 89-97.

13. Зеленников О.В. Влияние закисления воды на гаметогенез радужной форели *Parasalmo mykiss* // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. № 3. С. 388-401.

14. Мосягина М.В., Кузнецова И.В., Зеленников О.В., Гарлов П.Е. Морфо-функциональный анализ состояния стероидсекреторных клеток гонад молоди горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum)) в норме и при воздействии эстрадиолом // Цитология. 2003. Т. 45. № 5. С. 450-455.

15. Зеленников О.В. Сравнительный анализ состояния яичников у молоди тихоокеанских лососей в связи с проблемой становления моноциклии // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. № 4. С. 490-498.

16. Кузнецов Ю.К., Груслова А.Б., Зеленников О.В. Развитие гонад у молоди радужной форели и атлантического лосося после воздействия тестостероном в период, предшествующий цитологической дифференцировке пола // Вестник СПбГУ. 1999. Сер. 3. Вып. 1. С. 3-8.

17. Зеленников О.В. О перспективах естественного воспроизводства горбуши в бассейне Белого моря // Вестник СПбГУ. 2001. Сер. 3. Вып. 4. С. 78-81.

18. Зеленников О.В. Влияние закисления воды на развитие воспроизводительной системы и рост русского осетра в период дифференцировки пола // Вестник СПбГУ. 2003. Сер. 3. Вып. 1. С. 3-12.

19. Зеленников О.В., Федоров К.Е. Ранний гаметогенез горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum. при ее естественном и заводском воспроизводстве на островах Сахалин и Итуруп // Вопросы ихтиологии. 2005. Т. 45. № 5. С. 653-664.

20. Дорофеева Е.А., Алексеев А.П., Зеленников О.В., Зеленков В.М. Дальневосточная горбуша в бассейне Белого моря // Рыбное хозяйство. 2006. № 6. С. 71-73.

21. Зеленников О.В., Иванова Т.С., Мовчан Е.А., Мищенко О.В. О результатах мониторинга нерестовой миграции производителей горбуши в районе острова Средний // Вестник СПбГУ. 2006. Сер. 3. Вып. 4. С. 74-78.

22. Лунев Г.Е., Федоров К.Е., Зеленников О.В. Влияние экзогенного эстрадиола на развитие гонад горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum: Обработка молоди после дифференцировки пола // Вестник СПбГУ. 2007. Сер. 3. Вып. 3. С. 11-22.

23. Зеленников О.В., Мищенко О.В., Отставная Е.В. Морфофизиологический анализ состояния половых желез у молоди чавычи естественного и заводского происхождения. // Вестник СПбГУ. 2007. Сер. 3. Вып. 4. С. 125-128.

24. Алексеев А.П., Дорофеева Е.А., Зеленников О.В. Проблемы и перспективы акклиматизации дальневосточной горбуши в бассейне Белого моря. // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2008. № 8. С. 24-28.

25. Федоров К.Е., Зеленников О.В. Дифференцировка пола у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum. Роль онтогенетических факторов и влияние экзогенного тестостерона // Вестник СПбГУ. 2009. Сер. 3. Вып. 3. С. 111-121.

26. Мосягина М.В., Зеленников О.В. Экспериментальный анализ влияния половых стероидных гормонов на состояние стероидсекреторных клеток у молоди лососевых рыб // Вестник СПбГУ. 2012. Сер. 3. Вып. 4. С. 3-19.

27. Мосягина М.В., Зеленников О.В. Развитие стероидсекреторных клеток у молоди горбуши и миноги в период дифференцировки пола // Вестник СПбГУ. 2015. Сер. 3. Вып. 3. С. 36-45.

28. Погодин В.П., Борзов С.И., Мякишев М.С., Вараксин И.А., Зеленников О.В. Опыт двухлетнего выращивания молоди симы *Oncorhynchus masu* на рыбноводном заводе острова Итуруп // Известия ТИНРО. 2019. Т. 196. С. 182-192.

29. Зеленников О.В., Кузнецов Ю.К., Федоров К.Е. Особенности становления структуры и объема фонда прерителлогенных ооцитов у радужной форели *Parasalmo mykiss* // Труды ВНИРО. 2019. Т. 175. с. 76-85.

30. Мякишев М.С., Иванова М.А., Киселев В.А., Зеленников О.В. Экспериментальный анализ современного воспроизводства симы *Oncorhynchus masu* на рыбноводных заводах Сахалинской области // Известия ТИНРО. 2019. Т. 198. С. 195-208.

31. Зеленников О.В. Гаметогенез тихоокеанских лососей. 2. Развитие гонад у молоди кеты *Oncorhynchus keta* Walbaum при различных температурных режимах // Известия ТИНРО. 2019. Т. 198. С. 209-220.

32. Зеленников О.В., Кузнецов Ю.К., Мосягина М.В., Голод В.М. Гаметогенез каспийской кумжи *Salmo trutta caspinus* в течение периода первого полового созревания при создании маточного стада // Труды ВНИРО. 2019. Т. 177. С. 28-39.

33. Зеленников О.В. Гаметогенез тихоокеанских лососей. 3. Сравнительный анализ состояния гонад у молоди тихоокеанских лососей в связи с формированием плодовитости // Труды ЗИН. 2019. Т. 323. № 4. С. 429-441.

34. Мосягина М.В., Зеленников О.В. Особенности ультраструктурной организации стероидсекреторных клеток в гонадах у молодежи круглоротых и рыб // Труды ЗИН. 2019. Т. 323. № 4. С. 442-450.

35. Зеленников О.В. Шнайдер Т.А. Характеристика дальневосточной сардины *Sardinops melanostictus* из промыслового улова в районе острова Шикотан // Труды ВНИРО. 2019. Т. 178. С. 69-76.

Публикации в других изданиях

36. Zelennikov O.V., Fedorov K.E. The oogenesis inhibition, steroidogenesis and morphometric studies of the hypothalamo-hypophysal system in the Russian sturgeon exposed to low environmental pH // Symposium Proceedings. Culture and management of sturgeon and paddlefish : San Francisco State University July 14-18, 1996, p.171-180.

37. Мосягина М.В., Гарлов П.Е., Зеленников О.В., Федоров К.Е. Функциональная морфология стероидсекретирующих клеток гонад осетровых и лососевых рыб на разных этапах онтогенеза // «Экологические проблемы онтогенеза рыб. Физиолого-биохимические аспекты». 2001. С. 57-72.

38. Зеленников О.В., Мосягина М.В., Кузнецов Ю.К. Особенности раннего гаметогенеза кеты в связи с проблемой прогнозирования и регуляции темпов полового созревания производителей // Вопросы рыболовства. 2001. С. 93-96.

39. Мосягина М.В., Романовская-Романько Е.А., Зеленников О.В. О роли стероидсекретирующих клеток гонад в регуляции процессов раннего гаметогенеза у рыб // Вопросы рыболовства. 2001. С. 182-185.

40. Mosyagina M.V., Zelennikov O.V. The role of steroid-producing cells of gonads in regulation of processes of early gametogenesis in fishes // Tez. 21-st conference of European comparative endocrinologist. 2002. P. 146.

41. Zelennikov O.V., Fedorov K.E., Lunev G.E. Effect of sex steroid hormones on gametogenesis of pink salmon in the period of sex differentiation // Tez. 21-st conference of European comparative endocrinologist. 2002. P. 202.

42. Zelennikov O.V., Semenkova T.B., Bayunova L.V., Lunev G.E. Formation of monocycilia and its endocrine control during early ontogenesis of pacific salmons // Tez. 5th конф.intsimp. fish endocrinology. 2004. P. 15.

43. Mosyagina M.V., Zelennikov O.V. A study of steroid producing cells in gonads of fry of pacific salmon after hormonal treatment // Tez. 5th конф.intsimp. fish endocrinology, 2004. P. 75.

44. Отставная Е.Г., Лунев Г.Е., Зеленников О.В. Влияние длительного выдерживания молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum в пресной воде на состояние резервного фонда половых клеток // «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований». Вологда. 2008. С. 81-83.

45. Kuznetsov Yu., Mosyagina M., Zelennikov O. The formation of fecundity in ontogeny of lampreys // Jawless Fishes of the World: Volume 1. Eds: by Alexei Orlov and Richard Beamish. Cambridge Scholars Publishing. 2016. P. 323-345.

46. Зеленников О.В., Вараксин И.А. К методике определения соотношения полов у молоди горбуши // Бюллетень №13 «Концепции дальневосточной бассейновой программы изучения тихоокеанских лососей» Владивосток. ТИНРО. 2018. с.145-148.

47. Юрчак М.И., Мякишев М.С., Зеленников О.В. Влияние температуры воды на дифференцировку пола у молоди симы *Oncorhynchus masu* // «Комплексные исследования Мирового океана». Севастополь. ФГБУН МГИ. 2019. С. 257-259.

48. Зеленников О.В. Гаметогенез тихоокеанских лососей. 4. Состояние яичников у молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* и кеты *Oncorhynchus keta* от естественного нереста в период катадромной миграции // «Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации». Калининград. 2019. С. 100-104.

49. Зеленников О.В., Мосягина М.В., Кузнецов Ю.К., Голод В.М. Гаметогенез озерного лосося *Salmo salar morpha sebago* онежской популяции в течение периода первого полового созревания // «Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации». Калининград. 2019. С. 105-110.