

УДК 597.442:597–116:597–11

СТРОЕНИЕ ООЦИТОВ САХАЛИНСКОГО (ЗЕЛЁНОГО) ОСЕТРА *ACIPENSER MIKADOI* В ПРОЦЕССЕ ЗАВЕРШАЮЩИХ ЭТАПОВ СОЗРЕВАНИЯ ЯИЧНИКОВ

М.А. Седова, А.В. Пресняков

ВНИРО, г. Москва, sedova@vniro.ru

OOCYTE STRUCTURE OF SAKHALIN (GREEN) STURGEON *ACIPENSER MIKADOI* AT THE FINAL STAGES OF OVARY MATURATION

М.А. Sedova, A.V. Presnyakov

VNIRO, Moscow, sedova@vniro.ru

В начале XXI века в России к объекту Красной книги — сахалинскому (зелёному) осетру *Acipenser mikadoi* вновь усилился интерес как перспективному объекту искусственного воспроизводства и аквакультуры. Создание биотехники разведения этого вида даст возможность получать молодь искусственным путем и выпускать ее в реки природного ареала с целью поддержания исторически очень низкой численности его популяции, а также позволит увеличить число объектов товарного осетроводства.

Начиная с 2004 г., с участием сотрудников ВНИРО возобновлено изучение биологии сахалинского осетра, как в природе, так и в заводских условиях. Проводятся ежегодные экспедиции с целью изучения его экологии на р. Тумнин, где он обитает. На трех рыбоводных предприятиях России созданы ремонтно-маточные стада сахалинского осетра: 1) на Охотском ЛРЗ (Сахалинская область) с 1991 г., 2) на осетровом участке Анюйского ЛРЗ (Хабаровский край) с 2005 г., 3) в цехе по воспроизводству ценных видов осетровых рыб Алексинского химического комбината с 2005 г., и отрабатываются биологические основы разведения и товарного выращивания этого вида [Любаев, 2004; Микодина, Хрисанфов, 2008; www.aleksin.tula.ru/ecology.htm].

Сведения по биологии сахалинского (зелёного) осетра, документированные поимки которого известны только из р. Тумнин Хабаровского края, до недавнего времени можно было найти лишь в работах Артюхина и Андропова [1989, 1990], а также в монографии Артюхина [2008], вышедшей в свет после кончины автора благодаря усилиям его коллег и друзей. Только эти работы известны и зарубежным исследователям.

Строение половых клеток сахалинского осетра в литературе практически не описано. Имеется лишь одно краткое упоминание о строении семенника од-

ного самца в нерестовый период и микрофотографии его гистологических срезов [Артюхин, Андронов, 1990]. Трудность получения репрезентативного материала для различных исследований сахалинского осетра объяснима и состоит в том, что данный вид является объектом охраны. Он внесен в Красные книги МСОП, Российской Федерации, Хабаровского края и Сахалинской области. На этом основании уполномоченные органы выдают разрешение на ежегодный вылов нескольких экземпляров сахалинского осетра без изъятия, т.е. после проведения биологического анализа, взятия щуповых проб, гормональной стимуляции, получения половых продуктов живых особей возвращают обратно в естественную среду обитания.

В 2005–2008 гг. по прошествии 14 лет после последнего получения потомства сахалинского осетра вновь получена и выращивается его молодь [Микодина, Хрисанфов, 2008]. Например, в 2005 г. в условиях Охотского ЛРЗ для получения новой генерации использовали икру от дикой самки и сперму заводских самцов [Пресняков и др., 2006], что расширило возможности для сбора материала и получения новых данных.

Цель настоящего исследования описание строения ооцитов диких и заводских самок сахалинского осетра на завершающих этапах их созревания.

Материал и методика

Объектом исследования стали 4 самки сахалинского (зелёного) осетра. Две из них были выловлены в 2005 г. в р. Тумнин Хабаровского края и доставлены на Охотский рыбноводный завод. В статье использованы также некоторые показатели еще одной дикой самки, выловленной в р. Тумнин в 2008 г. Возраст этих рыб неизвестен. Одна самка в возрасте 14+ выбрана по экстерьерным показателям из маточного стада Охотского лососевого рыбноводного завода.

Перед рыбноводными манипуляциями самки были взвешены, измерены и рассчитаны некоторые морфофизиологические индексы [Правдин, 1966]. Для гистологического изучения использованы самки № 1–3, у которых в 2005 г. перед началом их гормональной стимуляции взяты щуповые (биопсийные) пробы. Материалом для гистологического исследования послужили ооциты из этих проб, зафиксированные в 4%-ном формальдегиде. Гистологическую проводку материала проводили через автомат карусельного типа модели STP-120. Заливку материала в парафин осуществляли на заливочной станции ЕС-350. Срезы толщиной 5–7 мк получали на санном микротоме НМ 440Е с автоматической ретракцией [Микодина и др., 2009]. Готовые срезы окрашивали квасцовым гематоксилином по Эрлиху [Ромейс, 1953] с докраской эозином. Для фотографирования микропрепаратов использовали микроскоп Olympus с автоматической видеокамерой Leica DC-100 с помощью программ DC Viewer и Photoshop CS2. Фотографии получали при увеличении окуляра 10× и объективов 5, 10, 20 и 40×. Микрофотографии анализировали с помощью системы анализа изображения Image-J.

Результаты и обсуждение

Биологические показатели самок. Биологические показатели самок, от которых получены ооциты, представлены в табл. 1. Масса тумнинских самок сахалинского осетра, включенных в наше исследование, варьировала между 18,32 и 29,0 кг, причем все дикие самки оказались крупнее заводской, а коэффициент зрелости самки № 1 был почти в два раза выше, чем у заводской самки № 3. По нашим данным, рабочая плодовитость сахалинского осетра различается: у самки № 3 она составила — 143 тыс. шт. (2005 г.), у № 4 — около 96 тыс. шт. (2008 г.)

Биологические показатели самок сахалинского (зелёного) осетра

№ самки	Происхождение самок, год поимки	Масса, кг	Масса без внутренностей, кг	Длина, см		Масса гонад, г		КЗ, %
				ав (TL)	ас	левая	правая	
1	р. Тумнин (2005)	18,320	15,810	148	137	1300	960	14,3
2	р. Тумнин (2005)	25,650	—	165	152	2860		11,2
3	Охотский ЛРЗ* (2005)	13,360	11,260	123	115	240	740	7,3
4	р. Тумнин (2008)	29,000	—	170	—	2941		10,4

* Самка погибла после рыболовных манипуляций.

По нашим данным (см. табл. 1), масса правого и левого яичников у сахалинского осетра неодинакова: у самки № 1 левая гонада в 1,4 раза больше, а у самки № 3 правая гонада больше в 3 раза. Мы пока затрудняемся в интерпретации этого факта.

Морфология ооцитов. Овулировавшие икринки диких самок сахалинского осетра имеют чёрную окраску (рис. 1). Судя по щуповым пробам 2005 г., у заводских самок они окрашены менее интенсивно и имеют серый цвет. Активированные яйца сахалинского осетра имеют слабую клейкость. Средняя масса одной икринки сахалинского осетра, по нашим данным, составляет 30,3 мг, диаметр неоплодотворенных яиц — 3,2–3,5 мм. Артюхин и Андронов [1990] указывали диаметр яиц 3,3–3,7, рабочую плодовитость — 60 и 140 тыс. икринок. Для сравнения отметим, что у зелёного осетра *Acipenser medirostris* Американского побережья икринки не только крупнее (в среднем 4,34 мм), но и выше рабочая плодовитость — 151 тыс. шт. [Van Eenennaam, Doroshov, 2002].

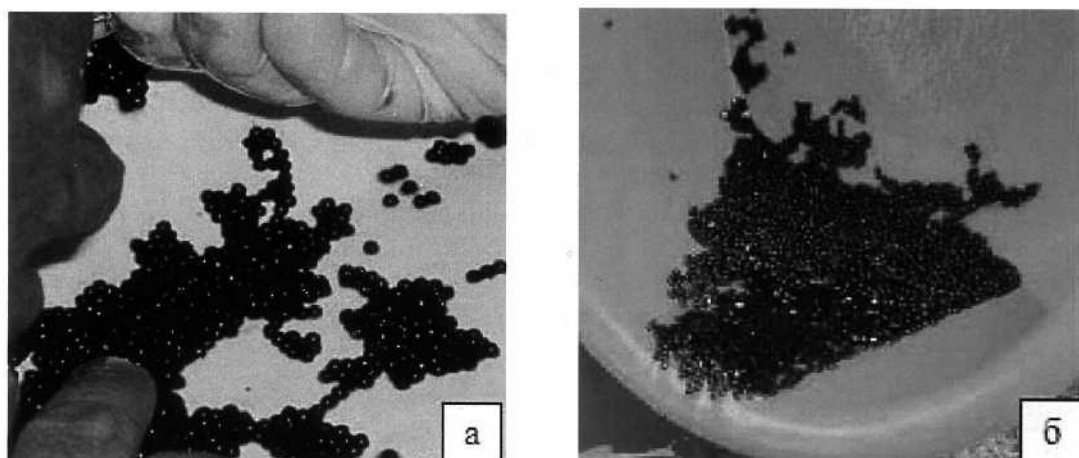


Рис. 1. Чёрная окраска овулировавших икринок диких самок сахалинского осетра: а — 2005 г.; б — 2008 г.

Тонкое строение ооцитов. Гистологическое исследование показало, что яйцевая оболочка всех ооцитов сахалинского осетра из исследованных нами 3-х яичников IV стадии зрелости состоит из нескольких слоев: студенистой

(бесструктурная, или хорион) и двухслойной желточной (sin радиальная, лучистая, *zona radiata*) — наружной и внутренней. Все ооциты на этой стадии зрелости поверх яйцевых оболочек покрыты слоем фолликулярных клеток — плоских на анимальном полюсе и разнокачественных (плоских и столбчатых) — на вегетативном. Поверх него расположена очень тонкая, бесструктурная теса *folliculi*. Все оболочки и собственно яйцо образуют фолликул. С внутренней стороны ооцита непосредственно к внутренней желточной оболочке примыкает собственно яйцо, одетое желточной мембраной. Под ней у икринок сахалинского осетра виден слой мелких пигментных гранул (рис. 2, *а, б*), заполненных меланином. Этот пигмент и определяет интенсивно чёрный цвет икры у всех осетровых. На срезах ооцитов сахалинского осетра видно, что пигментный слой у ооцитов заводской самки выражен крайне слабо (рис. 2, *в*) по сравнению с ооцитами диких особей. Очевидно, этим можно объяснить бледную (серую) окраску икры заводских самок в отличие от ярко чёрной — у диких. Считаю важным отметить, что в ооцитах всех самок нами не обнаружен слой кортикальных альвеол (гранул). В ооцитах сахалинского осетра из яичников IV стадии зрелости желток структурирован по-разному: на анимальном полюсе яйца желток мелкозернистый (см. рис. 2, *а*), на вегетативном — крупнозернистый (см. рис. 2, *б, в*).

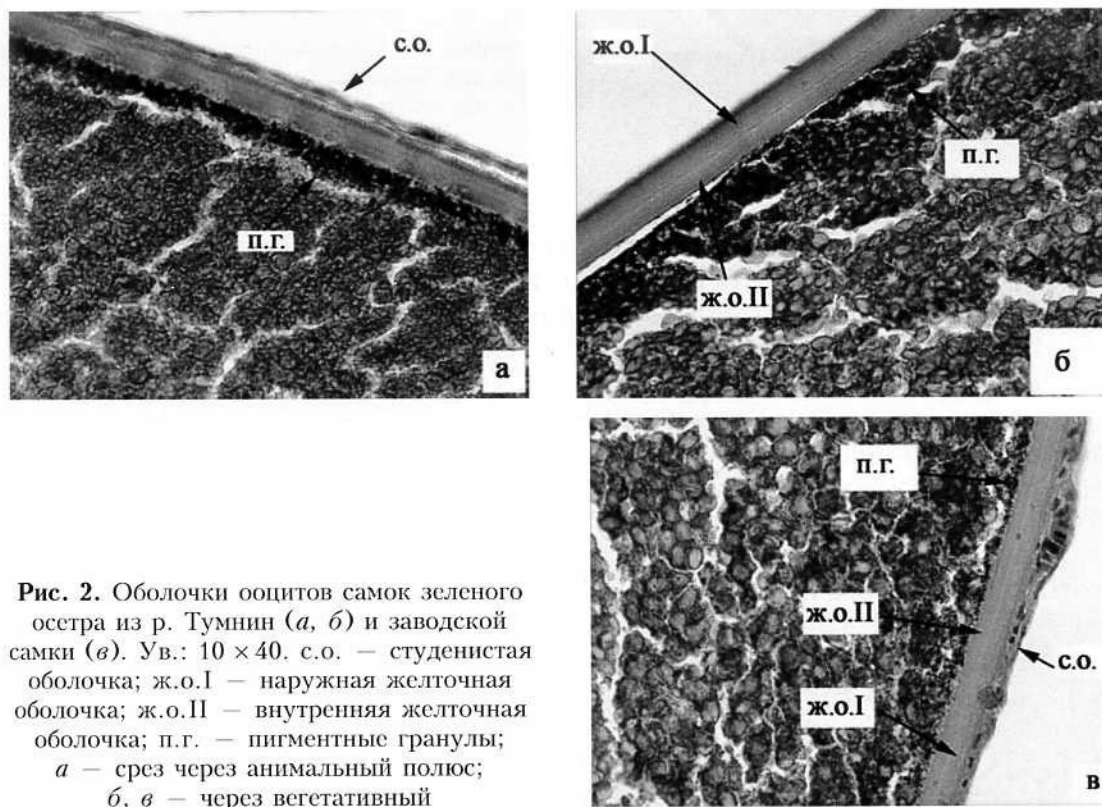


Рис. 2. Оболочки ооцитов самок зеленого осетра из р. Тумнин (*а, б*) и заводской самки (*в*). Ув.: 10 × 40. с.о. — студенистая оболочка; ж.о.І — наружная желточная оболочка; ж.о.ІІ — внутренняя желточная оболочка; п.г. — пигментные гранулы; *а* — срез через анимальный полюс; *б, в* — через вегетативный

Икра сахалинского осетра, как и у всех осетровых крупная, в связи с чем в поле зрения объектива при увеличении 10 × 40 не может попасть весь ооцит, а уместается лишь его небольшой сектор. На фрагменте анимального полюса ооцитов сахалинского осетра хорошо видны 1–3 микропиларных канала (рис. 3, *а–в*). Студенистая оболочка является продуктом секреции клеток фолликулярного эпителия и на более ранней стадии еще непосредственно связана с ним [Детлаф, Гинзбург, Шмальгаузен, 1981]. На рис. 3, *в* видно, что каналы микропиле в яйцевой оболочке в период до овуляции заняты выростами фолликулярных клеток — макроворсинками.

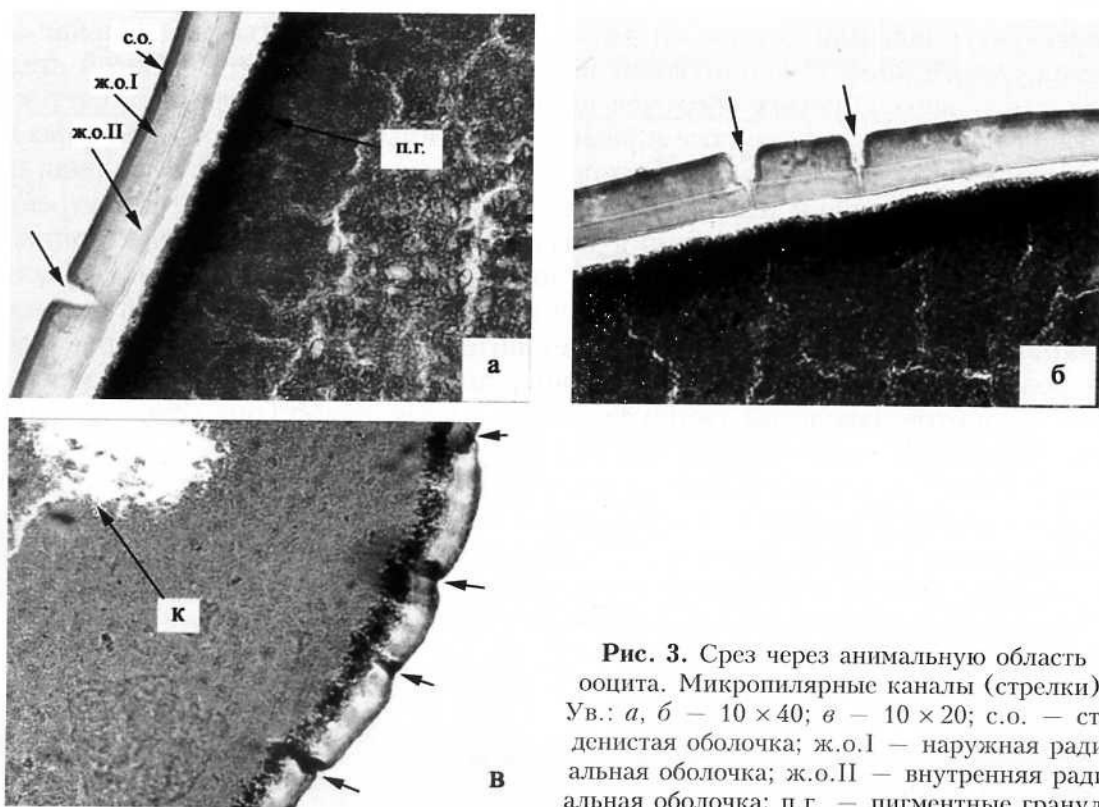


Рис. 3. Срез через анимальную область ооцита. Микропилярные каналы (стрелки). Ув.: а, б — 10×40 ; в — 10×20 ; с.о. — ступенчатая оболочка; ж.о.I — наружная радиальная оболочка; ж.о.II — внутренняя радиальная оболочка; п.г. — пигментные гранулы

Дикая самка из р. Тумнин № 1. В ооцитах самки сахалинского осетра, выловленной в природе, ядро (или «зародышевый пузырек») оказалось смещено в анимальную область. Его положение позволяет судить о том, достигли ли гонады IV завершающей стадии зрелости, на которой фолликулы приобретают способность реагировать на воздействие экзогенных гормонов созреванием. Этот процесс у сахалинского осетра сходен с другими видами осетровых. Хорошо известно, что при переходе гонад от IV незавершенной к IV завершённой стадии зрелости ядро в ооцитах смещается в направлении анимального полюса и оказывается полностью или почти полностью окруженным мелкозернистым желтком анимальной области [Трусов, 1964а,б, 1975; Казанский и др., 1978].

Ядро («зародышевый пузырек») заполнено ядерным соком (кариоплазмой), в котором расположено небольшое плотное образование, заключающее хромосомы, — кариосфера. На этой стадии ооцит содержит двойное (диплоидное) число хромосом, объединенных в тетрады, состоящие из двух временно соединившихся гомологичных хромосом отцовского и материнского геномов, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на две сестринские хроматиды. В таком виде хромосомный аппарат сохраняется до перехода ооцита к созреванию.

У сахалинского осетра в кариоплазме имеются многочисленные интенсивно окрашенные ядрышки (рис. 4,б). Они располагаются ближе к ядерной оболочке в той части ядра, которая обращена к вегетативному полюсу, как это описывали и у русского осетра Т.А. Детлаф, А.С. Гинзбург и О.И. Шмальгаузен [1981].

Ядерная оболочка образует множество выпячиваний, в этой области в цитоплазму проникает небольшое количество кариоплазмы, которая не растекается и не смешивается с желтком, а выглядит на срезах ооцита как прилегающая к ядру серповидная лакуна, заполненная лишенным желточных включений материалом (см. рис. 4).

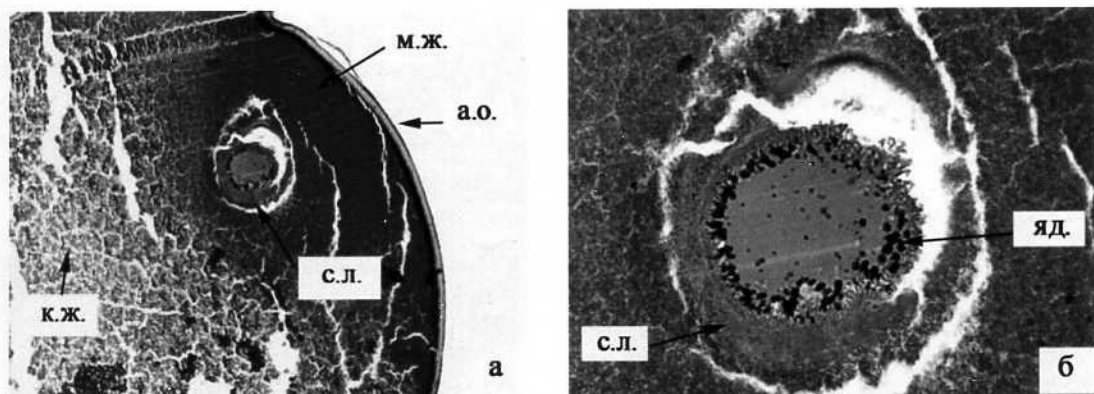


Рис. 4. Ооциты дикой самки сахалинского осетра № 1 из р. Тумнин. Ядро смещено к анимальному полюсу. Кариоплазма в виде сердцевидной лакуны. Ув.: *a* — 10×5 ; *b* — 10×20 ; а.о. — анимальная область; яд.- ядрышки; с.л. — серповидная лакуна; м.ж. — мелкозернистый желток; к.ж. — крупнозернистый желток

При переходе к IV завершающей стадии зрелости оболочка ядра ооцита разрушается, ядрышки исчезают и все содержимое кариоплазмы перетекает в цитоплазму (рис. 5, 6).

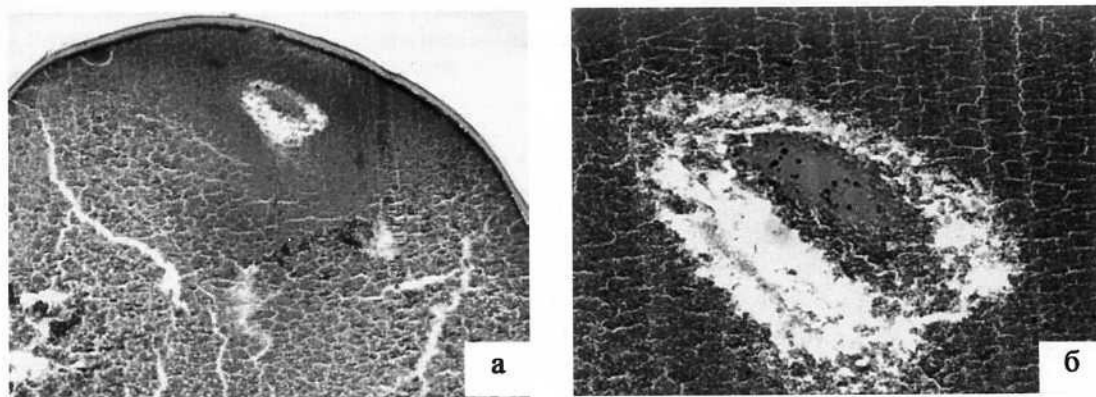


Рис. 5. Анимальная область ооцита с дезинтегрированной оболочкой ядра. Ув.: *a* — 10×5 ; *b* — 10×20

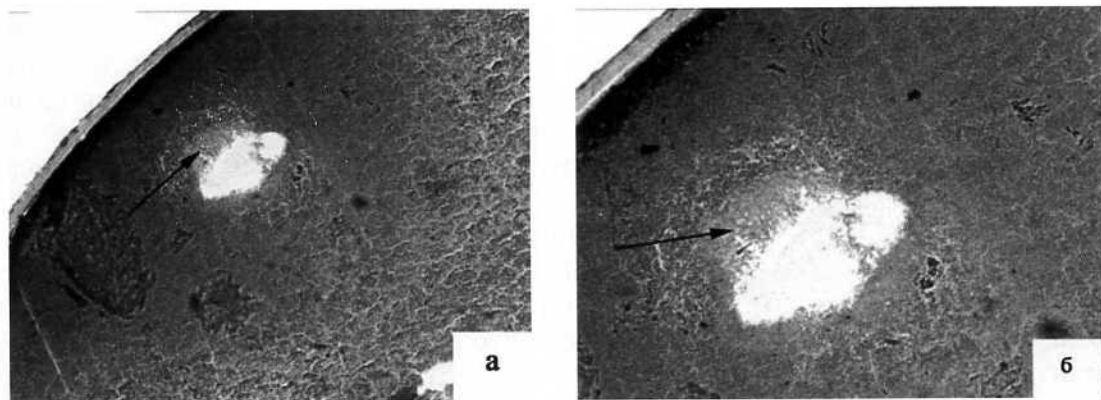


Рис. 6. Разрушение «зародышевого пузырька». Кариоплазма, выходящая в цитоплазму (стрелка). Дикая самка № 1. Ув.: *a* — 10×10 ; *b* — 10×20

Заводская самка сахалинского осетра. Аналогичные структурные особенности выявлены и у заводской самки. Ядро её ооцита расположено в мелкозернистой части анимального полюса. Ядрышки сконцентрированы в сторону вегетативного полюса. Кариоплазма имеет вид серповидной лакуны (рис. 7). На рис. 8 видно, что ядро полностью разрушено, но серповидная лакуна пока ещё сохраняется.

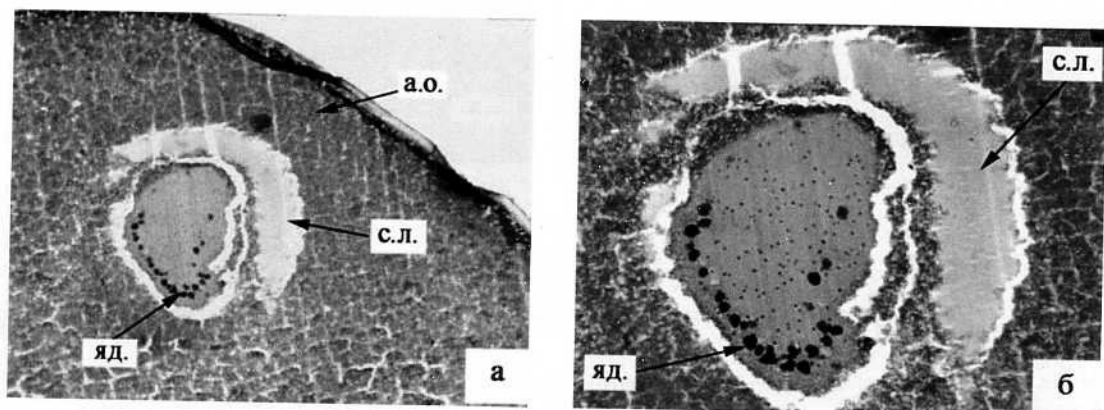


Рис. 7. Ооцит заводской самки № 3. Ядро ооцита, смещено к анимальному полюсу. Ув.: *a* — 10 × 10; *б* — 10 × 20; а.о. — анимальная область; яд. — ядрышки; с.л. — серповидная лакуна

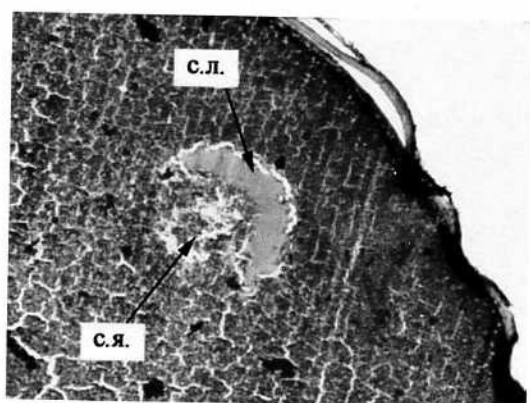


Рис. 8. Ооцит заводской самки с остатками ядра. Ув.: *a* — 10 × 10; с.я. — «следы» ядра; с.л. — серповидная лакуна

Дикая самка из р. Тумнин № 2. На гистологических препаратах в ооцитах дикой самки сахалинского осетра № 2 нами не было найдено ни одного четко сформированного ядра. По-видимому, по мере разрушения «зародышевого пузырька» кариоплазма постепенно распределяется в цитоплазме анимальной области ооцита и образует в ней густую сеть лакун (рис. 9), окрашивающихся гематоксилин-эозином в голубой цвет.

В литературе уже отмечали наличие в ооцитах осетровых таких полостей, заполненных веществом невыясненной природы [Атлас нарушений в гаметогенезе..., 2004]. Их рассматривали как нарушение в структуре ооцита и считали аномальным явлением. Мы же полагаем, что это вполне может быть характерной особенностью строения ооцитов не только сахалинского осетра, но и других видов осетровых рыб. О ней также упоминается и в широко известной книге «Развитие осетровых рыб» [Детлаф, Гинзбург, Шмальгаузен, 1981]. Основываясь на наших данных, мы заключаем, что голубые лакуны между гранулами мелкозернистого желтка анимального полюса не аномалия, а остатки кариоплазмы. Это представляется правдоподобным также в связи с отсутствием на

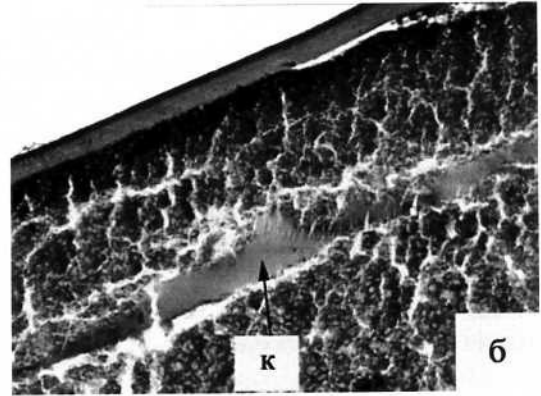
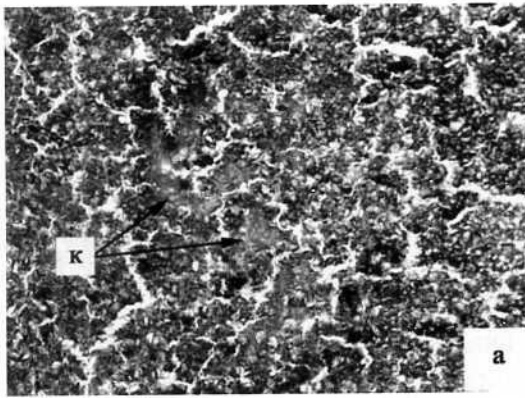


Рис. 9. Анимальная область ооцитов дикой самки сахалинского осетра № 2 с голубыми лакунами, заполненными кардиолазмой после разрушения «зародышевого пузырька». Ув.: *а, б* — 10×20 ; *в* — 10×40 ; *к* — кардиолазма

срезах ооцитов осетровых, например персидского осетра [Артюхин, 2008], кортикальных альвеол. Нельзя исключать, что у осетровых кардиолазма высокоосмотична и может играть у них свою роль в образовании перивителлинового пространства, которое у всех видов осетровых очень небольшое и образуется только в области анимального полюса яйца.

Неожиданным феноменом оказалось то, что на некоторых срезах ооцитов диких самок сахалинского осетра в районе анимальной области кардиолазма находилась между желточной оболочкой и мембраной яйца (рис. 10). На наш взгляд — это нарушение в строении.

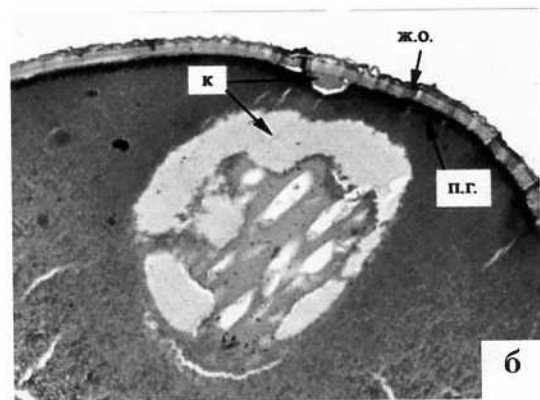
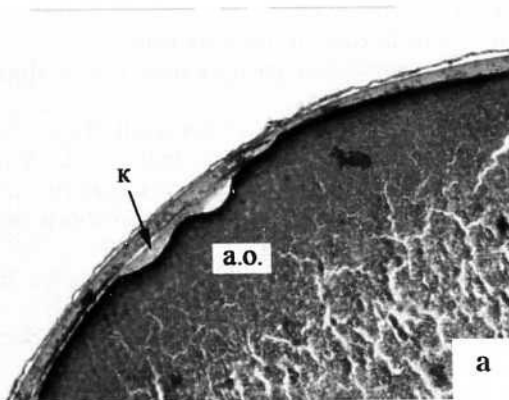


Рис. 10. Анимальная область ооцитов дикой самки № 2 (*а*) и № 1 (*б*) с кардиолазмой между яйцевой желточной оболочкой и пигментными гранулами и пикнотичным ядром. Ув.: 10×10 ; *к* — кардиолазма; *п.г.* — пигментные гранулы; *ж.о.* — желточная оболочка

Заключение

Считаем важным констатировать, что в данной статье впервые описано строение ооцитов сахалинского осетра из яичников IV стадии зрелости. Показано, что исследованные самки по строению ооцитов отличаются разнокачественностью, отражающей степень подготовленности каждой из них к нересту. Установлено, что яичники и дикой самки № 1, и заводской самки сахалинского осетра в период наших исследований достигли IV стадии зрелости, о чём свидетельствует смещение ядра в мелкозернистую часть анимальной области. Гонады дикой самки № 2 находились на IV завершающей стадии зрелости, а ооциты оказались более продвинутыми в развитии. Это подтверждается разрушением «зародышевого пузырька» в её ооцитах и распределением кариоплазмы в цитоплазме анимальной области ооцита с образованием в ней густой сети лакун, окрашивающихся в голубой цвет. Нами впервые отмечено, что небольшое количество кариоплазмы может попадать между желточной оболочкой и собственно яйцевой мембраной. Считаем это аномалией строения. На срезе через анимальную область ооцита в яйцевой оболочке видны несколько (1–2, 3–4) микропиллярных каналов.

Отметим, что, несмотря на продолжительную транспортировку диких самок из низовьев р. Тумнин на юго-восток Сахалина (Охотский ЛРЗ), именно одна из них (№ 2) созрела в заводских условиях и отдала 2860 г икры. Сравнение состояния ее ооцитов с яйцеклетками двух других исследованных нами самок: дикой и заводской, показывает, что стимуляция овуляции дикой самки № 2 была начата вовремя, т.е. до окончания миграции ядра к анимальному полюсу и начала дезинтеграции ядерной оболочки. Двух других самок, очевидно, можно считать перезревшими, ибо в их ооцитах ядро закончило миграцию на анимальный полюс, и произошла дезинтеграция ядерной оболочки. Стимуляция завершающих этапов созревания и овуляции у этих самок успеха не имела.

Подчеркнем, что именно дикая самка № 2 не только созрела после гормональной стимуляции, но от неё с участием стимулированных заводских самцов получено потомство [Микодина, Хрисанфов, 2008]. После его выращивания в 2007 г. 40 экз. двухлеток [Васильева, 2007], а в 2009 г. — 15 четырехлеток были выпущены в оз. Тунайча, расположенного на юго-востоке о. Сахалин, куда ранее заходил сахалинский осётр.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексинский химический комбинат. 2009. www.alcksin.tula.ru/ecology.htm
- Артюхин Е.Н. 2008. Осетровые (экология, географическое распространение и филогения). — СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та. — 137 с.
- Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. 1989. О некоторых чертах биологии осетра р. Тумнина // Осетровое хозяйство водоемов СССР. Тез. докл. Всеросс. конф. Ч. 1. Астрахань. — С. 9–10.
- Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. 1990. Морфобиологический очерк зелёного осетра *Acipenser medirostris* (Chondrostei, Acipenseridae) из реки Тумнин (Датта) и некоторые аспекты экологии и зоогеографии осетровых // Зоол. журн. Т. 69. Вып. 12. — С. 81–91.
- Атлас нарушений в гаметогенезе и строении молодёжи осетровых. 2004. // Акимова Н.В., Горюнова В.Б., Микодина Е.В. и др. — М.: Изд-во ВНИРО. — 120 с.
- Васильева О. 2007. Царь-рыба меняет прописку // Российская газета — Дальний Восток. № 4398. 27 июня 2007 г.
- Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. 1981. Развитие осетровых рыб. — М.: Наука. — 224 с.
- Казанский Б.Н., Феклов Ю.А., Подушка С.Б., Молодцов А.Н. 1978. Экспресс метод определения степени зрелости гонад у производителей осетровых // Рыб. хоз-во. № 2. — С. 24–27.
- Лубаев В.Я. 2004. Маточное стадо сахалинского (зелёного) осетра как генофондная основа для сохранения вида // Мат-лы межд. конф. «Сохранение генетических ресурсов». Санкт-Петербург, 19–22 октября 2004 г. — С. 812–813.

- Микодина Е.В., Хрисанфов В.Е. 2008. Сахалинский осётр: краткая хронология работ по изучению его биологии, разработке технологии искусственного воспроизводства и реакклиматизации в природном ареале // Результаты и перспективы акклиматизационных работ. Мат-лы научно-практической конф. Клязьма, 10–13 декабря 2007 г. — М.: Изд-во ВНИРО. — С. 79–86.
- Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А., Микулин А.Е., Пьянова С.В., Полуэктова О.Г. 2009. Гистология для ихтиологов (опыт и советы). — М.: Изд-во ВНИРО. — 112 с.
- Правдин И.Ф. 1966. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). — М.: Изд-во Пищевая пром-ть. — 376 с.
- Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. — М.: Иностранная литература. — 718 с.
- Трусов В.З. 1964а. Некоторые особенности созревания и шкала зрелости половых желёз осетровых // Тр. ВНИРО. Т. 56. — С. 69–78.
- Трусов В.З. 1964б. Метод определения степени зрелости половых желёз самок осетровых рыб // Рыбное хоз-во. № 1. — С. 26–28.
- Хрисанфов В.Е. 2005. Сахалинский осётр *Acipenser medirostris*, Ayres 1854 — исчезающий вид отечественной ихтиофауны // Зоокультура и биологические ресурсы. Материалы научно-практической конференции ИПЭЭ РАН И МСХА им. К.А.Тимирязева, 4–6 февраля 2004 г. Москва. — С. 58–61.
- Микодина Е.В. 2006. The Sakhalin sturgeon — *Acipenser medirostris*, a new object in Russian aquaculture // Abstracts of International Conference «Aqua-2006». 9–13 May, Florence, Italy. — P. 609.
- Микодина Е.В., Хрисанфов В.Е., Любаев В.Я., Пресняков А.В. 2006. Artificial spawning of Sakhalin sturgeon in Russia // Abstracts of International Conference «Aqua-2006». 9–13 May, Florence, Italy. — P. 610.
- Van Eenennaam J.P. and Doroshov S.I. 2002. Reproductive conditions of the Klamath River green sturgeon (*Acipenser medirostris*) // 5th Int. Symp. on Sturgeon. Coll. Ex. Abstracts and Presentation Summaries. Oshkosh, Wisconsin, USA, July 8–13. — С. 122.