БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ И ЭКОЛОГИЯ

Надежда Сергеевна КОЛОСОВА[1]
Александр Германович СЕЛЮКОВ[2]
Вера Александровна БОГДАНОВА[3]

УДК 597:57.017.642:576.35

ПЕРВИЧНЫЕ ГОНОЦИТЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧИРА (*COREGONUS NASUS*) В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ ЗА ПРЕДЕЛАМИ АРЕАЛА

[1] магистрант кафедры экологической генетики,
Тюменский государственный университет
kolosovans@gmail.com

[2] доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии
и эволюционной экологии животных,
Тюменский государственный университет
ags-bios@yandex.ru

[3] кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории аквакультуры и воспроизводства ценных видов рыб,
Государственный научно-исследовательский институт озерного
и речного рыбного хозяйства имени Л. С. Берга (г. Санкт-Петербург)
vera-bogdanova@yandex.ru

Аннотация

Оценивались состояние и уровень пролиферативной активности первичных гоноцитов (ПГ) у эмбрионов и предличинок чира, выращиваемого в условиях аквакультуры за пределами естественного ареала. С использованием гистологического анализа

Цитирование: Колосова Н. С. Первичные гоноциты в эмбриогенезе чира (*Coregonus nasus*) в условиях аквакультуры за пределами ареала / Н. С. Колосова, А. Г. Селюков, В. А. Богданова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2018. Том 4. № 1. С. 50-60.
DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-1-50-60

© ФГАОУ ВО Тюменский государственный университет

установлено, что у зародышей цитоморфологические параметры гоноцитов — размеры клеток и ядер, число ядрышек — в течение всего эмбриогенеза варьируют незначительно, несколько возрастая к началу постэмбрионального периода. При увеличении количества ПГ к моменту завершения эмбрионального развития доля полиморфноядерных клеток стремилась к снижению, а доля клеток с митозами повышалась. В течение всего зародышевого развития встречались двухъядерные ПГ и гоноциты в составе синцитиальных комплексов, сложность которых повышалась до трех клеток во вторую половину эмбриогенеза. В постэмбриональный период синцитиальные образования отсутствовали. При сопоставлении этих данных с материалами, полученными на зародышах данного вида от производителей из природного ареала, проинкубированных в Тобольском инкубационном цехе, отмечены незначительные цитоморфологические различия.

Показано более раннее начало митотической активности первичных половых клеток, сконцентрированных к моменту вылупления в области будущего зачатка гонад у эмбрионов чира одомашненного стада, что связано, по-видимому, с разницей температур инкубации икры в регионах различных климатических зон.

Ключевые слова

Аквакультура, чир, эмбриогенез, первичные гоноциты.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-1-50-60

Сиговые рыбы *(Coregonidae)* весьма широко распространены в высокоширотных водоемах на территориях Евразии и Северной Америки. В России эти виды относятся к национальному достоянию и являются одними из ведущих объектов промышленного рыболовства.

В настоящее время почти повсеместно отмечается серьезное сокращение численности природных популяций сиговых, одной из основных причин которого является чрезмерно высокое промысловое изъятие [4], а также загрязнение водоемов, крайне негативно влияющее на эти виды как особо чувствительные к интоксикации среды [8].

Чир — важный промысловый объект на территории северных регионов. Неудовлетворительное состояние его популяции в Обском бассейне делает важными работы по искусственному воспроизводству этого ценного вида и актуализирует проблему формирования и эксплуатации маточных стад.

В этой связи важное научное и практическое значение имеют вопросы воспроизводства, поскольку разведение рыб в искусственных водоемах при неблагоприятных условиях может привести к болезням, стрессу, ухудшению темпа роста, понижению жизнестойкости молоди [1]. Для углубленного понимания процессов функционирования репродуктивной системы особое значение имеют фундаментальные исследования, в частности, изучение процесса формирования линии половых клеток на разных стадиях (этапах) эмбрионального и раннего постэмбрионального развития.

Цель работы состояла в оценке характера и уровня трансформационных преобразований первичных гоноцитов у эмбрионов чира в условиях аквакультуры за пределами естественного ареала.

Материалы и методика

Для изучения формирования линии половых клеток в эмбриогенезе сиговых рыб с декабря по май в 2014-2015 гг. на рыбоводном хозяйстве ООО «Форват» (Ленинградская область) были отобраны эмбрионы чира. Температурный режим в инкубационных аппаратах в течение эмбриогенеза был представлен в нашей предыдущей работе [9]. Исследование эмбрионов проводили в лаборатории реконструкции биосистем Института биологии Тюменского государственного университета. Эмбрионы были зафиксированы в смеси Бродского на 20, 45, 72, 89 и 131 (вылупление) сутки после оплодотворения; личинки — в двухнедельном возрасте (таблица 1). Гистологический анализ проводили с применением стандартных гистологических методик [5, 7]. Для сравнения были использованы материалы [8], ранее полученные от природной популяции чира, взятые из естественного ареала (р. Рахтынья, приток р. Северной Сосьвы), эмбриональное развитие которых проходило в Тобольском инкубационном цехе.

Зародыши проводили через спирты возрастающей концентрации; инфильтрацию проводили в ксилол-парафине и на аппарате EC 350-1 («MICROM») заливали в парафин. Серийные срезы зародышей (5 мкм) готовили на автоматизированном ротационном микротоме HM 355S («MICROM»). Приготовленные срезы окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну [7] и заключали под покровное стекло в среду BioMount. Подготовленные препараты фотографировали при увеличениях 100×, 200×, 400× и 1 000× видеокамерой AxioCam MRc5, установленной на микроскопа «AxioImager A1» (Zeiss); использовали сертифицированную программу AxioVision Release 4.7.1.

Было проанализировано 1 512 первичных гоноцитов (ПГ) у 46 эмбрионов и 22 личинок чира. Отмечали локализацию, цитоморфологические особенности, ядерно-цитоплазматическое соотношение половых клеток и производили соответствующие измерения. Полученные данные были обработаны в программах MS Excel и STATISTICA Statsoft.

Результаты исследований

В процессе зародышевого развития эмбрионов чира клетки первичных гоноцитов распределялись под формирующимися вольфовыми протоками, постепенно мигрируя в область гонотомов. Одновременно изменялись и их специфические состояния: встречались как одиночные ПГ, так и группы сдвоенных и строенных половых клеток (синцитиальные комплексы), полиморфноядерные, многоядерные, а также клетки на стадии митоза.

На 12 стадии зародышевого развития (20 сут после оплодотворения) ПГ морфологически несколько отличались от мезенхимных клеток. Их ядерно-цитоплазматическое соотношение в сравнении с таковым у соматических клеток было смещено в сторону цитоплазмы (рис. 1 а, б; таблица 1). На данной стадии зародышевого развития количество ядрышек варьировало в пределах 1-4, а

количество ПГ оставалось сравнительно небольшим (рис. 2, таблица 1), что могло быть обусловлено неполным обособлением первичных гоноцитов и низким уровнем специфической пролиферации.

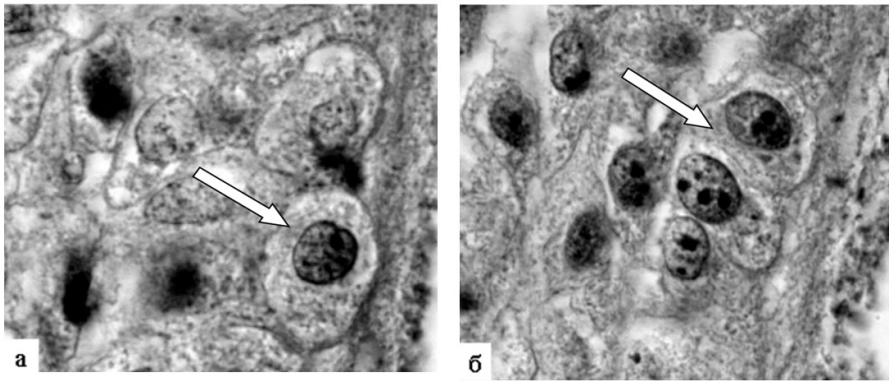

Рис. 1. ПГ эмбрионов чира на 20 сут после оплодотворения (12 стадия эмбриогенеза); увел.: 1 000×.
а — типичный ПГ (стрелка) среди соматических клеток;
б — первичные гоноциты в составе синцитиального комплекса (стрелка)

Fig. 1. PG embryo of the broad whitefish for 20 days after fertilization (stage 12 of the embryogenesis); zoom × 1,000;
a — typical PG (arrow) among somatic cells;
b — primary gonocytes in the syncytial complex (arrow)

На 14 стадии эмбриогенеза, через 45 сут после оплодотворения, отмечали существенное увеличение общего количества ПГ (рис. 2). При этом размеры клеток и количество ядрышек не изменялись (таблица 1).

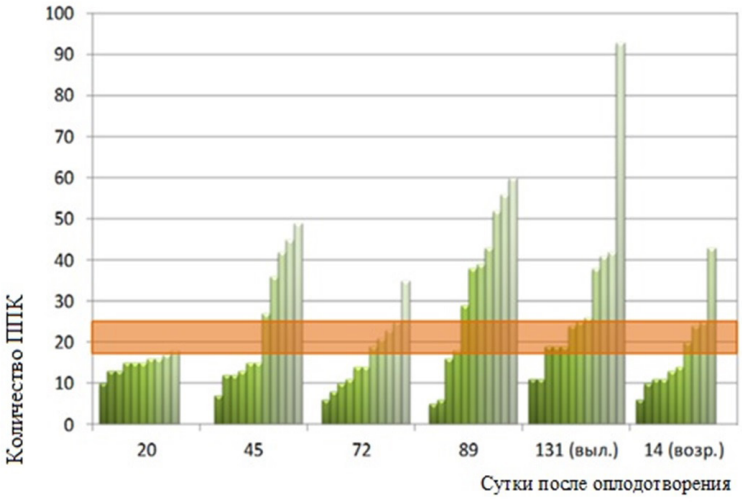

Рис. 2. Количественное соотношение первичных гоноцитов у чира в период эмбрионального развития

Fig. 2. Quantitative ratio of primary gonocytes of whitefish in the period of embryonic development

Таблица 1

Динамика цитометрических показателей первичных гоноцитов у эмбрионов чира

Table 1

Dynamics of cytometric parameters of primary gonocytes in embryos of whitefish

Сутки после оплодотворения	Дата	Число изученных ПГ	Число одиночных ПГ	$D_{пг}$, мкм $\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$ / min-max	$d_{ядра}$, мкм $\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$ / min-max	Число ядрышек $\overline{X} \pm S_{\overline{x}}$ / min-max	ЯЦО, % $\frac{S_я}{S_{кл} - S_я} \times 100$
20	27.12.14	148	10,3±1,7 / 6-13	16,2±0,1 / 13,4-20,4	8,9±0,1 / 7,1-11,0	2,1±0,1 / 1-4	49,7±2,5 / 40,1-69,2
45	21.01.15	273	19,5±3,8 / 4-38	16,9±0,2 / 12,4-22,8	9,1±0,1 / 6,5-13,3	2,0±0,05 / 1-4	47,5±2,8 / 39,3-73,6
72	17.02.15	186	13,5±2,7 / 4-34	16,8±0,3 / 12,1-23,8	9,2±0,1 / 6,2-12,3	1,9±0,1 / 1-4	49,6±2,7 / 32,2-68,7
89	06.03.15	360	27,4±5,2 / 5-53	16,4±0,7 / 11,5-23,9	8,8±0,3 / 6,3-13,3	1,9±0,1 / 1-4	47,2±3,0 / 33,4-72,7
131 (вылупление)	17.04.15	368	26,5±4,7 / 8-67	18,1±0,2 / 12,3-24,9	9,8±0,1 / 6,4-12,8	2,0±0,1 / 1-5	51,2±3,6 / 37,9-83,3
14 (возраст)	01.05.15	177	15,7±3,1 / 6-39	17,1±0,3 / 13-22,4	9,7±0,1 / 7,4-12,6	2,2±0,1 / 1-5	53,0±2,8 / 46,5-74,7

К 72 сут общее число первичных половых клеток снижалось, их размеры незначительно возрастали, а к 89 сут количество ПГ вновь увеличивалось (рис. 2). Во время миграции клеток и их концентрации под Вольфовыми протоками отмечали значительное число первичных гоноцитов (рис. 3).

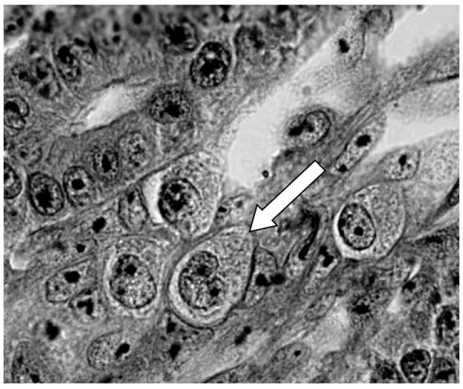

Рис. 3. Полиморфноядерные (стрелка) и типичные первичные гоноциты эмбрионов чира под Вольфовыми протоками; 89 сут после оплодотворения; увел.: 1 000×

Fig. 3. Polymorphonuclear (arrow) and typical primary gonocytes of whitefish's embryos under the Wolff ducts; 89 days after fertilization; zoom × 1,000

Максимальное число ПГ отмечается на момент вылупления (131 сут). К этому времени ядерно-цитоплазматическое отношение увеличилось, что обусловлено возрастанием размеров ядер. В них также возросло число ядрышек: от 1 до 5 (таблица 1). На данном этапе было отмечено наибольшее количество митозов (таблица 1).

Однако в дальнейшем, к двухнедельному возрасту, было установлено устойчивое снижение общего количества типичных гоноцитов и полиморфноядерных клеток. В этот же период вследствие клеточной пролиферации снижались размеры клеток при неизменном диаметре ядер, что сопровождалось увеличением ядерно-цитоплазматического отношения (таблица 1).

Таким образом, в течение эмбрионального развития число первичных гоноцитов эмбрионов чира характеризуется определенной количественной и морфологической вариабельностью с устойчивой тенденцией возрастания их числа к моменту вылупления. В постэмбриональный период доля синцитиальных образований, многоядерных и полиморфноядерных клеток столь же закономерно снижалась при одновременном возрастании доли одиночных первичных гоноцитов.

Обсуждение результатов

Проведенные исследования морфологической гетерогенности первичных гоноцитов в эмбриогенезе чира позволили выявить ряд особенностей становления линии половых клеток этого вида в условиях аквакультуры за пределами естественного ареала.

Известно, что первичные гоноциты идентифицируют по характерным морфологическим признакам уже с момента их обособления от соматических [6, 10]. При этом установление количества первичных гоноцитов является важным показателем направления цитологической дифференцировки пола и в целом характеризует процесс формирования линии клеток зародышевого пути [9].

Показано, что ПГ у эмбрионов чира можно охарактеризовать как клетки с умеренно высоким количественным и морфологическим диапазоном с тенденцией возрастания к этапу пигментации глаз.

По данным последних лет, количество первичных половых клеток в эмбриогенезе рыб может коррелировать с направлением дифференцировки гонад. Так, при определении количества первичных половых клеток (или ПГ в данном исследовании) на разных стадиях эмбрионального развития медаки было установлено [12], что большое количество ППК свидетельствует о формировании гонад по типу яичников, а низкое указывает на развитие гонад в направлении семенников. Таким образом, можно предположить, что эмбрионы чира, количество ПГ у которых ниже интервала 13-23 клеток, являются потенциальными самцами, тогда как зародыши, у которых этот показатель выше, — потенциальными самками (рис. 3).

На ранних стадиях эмбрионального развития (20 и 45 сут после оплодотворения) первичные половые клетки только начинают формироваться, и направление дифференцировки пола явно не выражено [11, 12].

Углубленные исследования количественных характеристик ППК у эмбрионов рыб, разводимых в условиях аквакультуры, и их предположительная связь с направлением дифференцировки пола может иметь важное практическое значение для разработки методов ранней диагностики детерминации пола у рыб и оценки соотношения полов в генерациях одомашненных популяций на эмбриональных стадиях.

Отметим, что общее число первичных гоноцитов у зародышей чира одомашненного стада незначительно различалось с таким же показателем числа клеток зародышей из естественного ареала [2]. У первых число ПГ на момент вылупления варьировало от 11 до 93 при том, что средний показатель практически не изменяется. У эмбрионов чира, развитие которых проходило за пределами естественного ареала, количество первичных гоноцитов изменяется в пределах от 10 до 43 клеток [2].

Число митозов и темп миграции характеризуется видовыми особенностями [10]. У эмбрионов чира маточного стада, сформированного в Северо-Западном регионе, митозы первичных гоноцитов, сконцентрированных в области будущего зачатка гонад, впервые были отмечены уже на момент вылупления. У предличинок чира из естественного ареала митозы в этом возрасте еще не выявлялись [2].

Как известно, скорость эмбрионального развития во многом определяется температурой воды [3]. В связи с этим очевидно, что наблюдаемая разница связана с различиями в температурном режиме в процессе инкубации икры чира одомашненного стада (Ленинградская область) и чира из природной среды (Тобольский завод), что обусловлено региональными климатическими особенностями. Таким образом, бóльший объем тепла, который получают эмбрионы чира в период инкубации на Северо-Западе, не только ускоряет их рост, общее развитие и определяет более ранние сроки вылупления, но также приводит к ускорению процессов, связанных со становлением генеративной функции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрияшева М. А. Генетические аспекты разведения сиговых рыб / М. А. Андрияшева. СПб.: ГосНИОРХ, 2011. 639 с.
2. Ефремова Е. В. Ранний гаметогенез сиговых рыб р. *Coregonus* в условиях искусственного содержания: автореф. … канд. биол. наук. М.: ВНИРО, 2013. 24 с.
3. Лебедева О. А. Сравнительная характеристика раннего онтогенеза сиговых рыб / О. А. Лебедева // Природа и хозяйственное использование озер Северо-Запада Русской равнины. Л.: ЛПТИ, 1976. 30-57 с.
4. Литвиненко А. И. Современное состояние и проблемы восстановления запасов сиговых рыб Обь-Иртышского бассейна / А. И. Литвиненко, Я. А. Капустина, А. К. Матковский, С. М. Семенченко // Материалы девятого Международного научно-производственного совещания «Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб». Тюмень, 2016. С. 57-60.
5. Микодина Е. В. Гистология для ихтиологов: опыт и советы / Е. В. Микодина и др. М.: ВНИРО, 2009. 112 с.
6. Персов Г. М. Дифференцировка пола у рыб. Л.: ЛГУ, 1975. 148с.
7. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. М.: Изд-во иностранной литературы, 1953. 718 с.
8. Селюков А. Г. Морфофункциональный статус рыб Обь-Иртышского бассейна в современных условиях. Тюмень: ТюмГУ. 2007. 184 с.
9. Селюков А. Г. Формирование фонда герминативных стволовых клеток в эмбриогенезе сигов балтийского бассейна / А. Г. Селюков, М. В. Кибалова, Е. В. Михаленко, В. А. Богданова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2016. Т. 2. № 4. С. 68-81. DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-4-68-81
10. Extavour C. G. M. Evolution of the Bilaterian Germ Line: Lineage Origin and Modulation of Specification Mechanisms / C. G. M. Extavour // Integrative and Comparative Biology, Sympos. «Key Transitions in Animal Evolution». Oxford: Oxford University Press, 2007. Pp. 1-16. DOI: 10.1093/icb/icm027
11. Kobayashi T. In Vitro Germ Cell Differentiation During Sex Differentiation in a Teleost Fish / T. Kobayashi // Intern. Journ. Dev. Biol. 2010. V. 54. Pp. 105-111. DOI: 10.1387/ijdb.082836tk
12. Kurokawa H. Germ Cells Are Essential for Sexual Dimorphism in the Medaka Gonad / H. Kurokawa, D. Saito, S. Nakamura et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007. Vol. 104. No 43. Pp. 16958-16963. DOI: 10.1073/pnas.0609932104

Nadezhda S. KOLOSOVA[1]
Alexander G. SELYUKOV[2]
Vera A. BOGDANOVA[3]

PRIMARY GONOCITY IN THE EMBRYOGENESIS OF *COREGONUS NASUS* IN THE AQUACULTURE OUTSIDE THEIR NATURAL AREAL

[1] Master Student, Department of Ecological Genetics,
University of Tyumen
kolosovans21@gmail.ru

[2] Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Zoology
and Evolution Ecology of Animals, University of Tyumen
ags-bios@yandex.ru

[3] Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher,
Aquaculture Laboratory, Berg State Research Institute
on Lake and River Fisheries (Saint Petersburg)
vera-bogdanova@yandex.ru

Abstract

This article evaluates the state and level of proliferative activity of primary gonocytes (PG) in the embryos and larvae of broad whitefish from aquaculture. The authors have found that the cytomorphological parameters of gonocytes (the size of cells and nuclei, as well as the number of nucleoli) vary insignificantly in such embryos throughout embryogenesis, slightly increasing closer to the beginning of the postembryonal period. When increasing the number of PG cells by the end of embryogenesis, the proportion of polymorphonuclear cells decreased, while the number of mitosis cells increased. Dual-core PG and gonocytes in the composition of syncytial complexes could be observed during the whole embryogenesis. Syncytial formations in the post-embryonic period were absent. There were insignificant

Citation: Kolosova N. S., Selyukov A. G., Bogdanova V. A. 2018. "Primary Gonocity in the Embryogenesis of *Coregonus nasus* in the Aquaculture Outside Their Natural Areal". Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 4, no 1, pp. 50-60.
DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-1-50-60

© University of Tyumen

cytomorphological differences between primary gonocytes of embryos obtained from domestic stock and natural spawners.

The authors have observed earlier mitotic activity of the primary germ cells by the time of hatching in embryos of broad whitefish from domestical stock. That seems to depend on the difference in incubation temperatures in regions of different climatic zones.

Keywords

Aquaculture, broad withefish, embryogenesis, primary gonocytes.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-1-50-60

REFERENCES

1. Andriyasheva M. A. 2011. Geneticheskiye aspekty razvedeniya sigovykh ryb [Genetic Aspects of the Breeding of Whitefish]. Saint Petersburg: GosNIORKH.
2. Efremova E. V. 2013. "Ranniy gametogenez sigovykh ryb r. *Coregonus* v usloviyakh iskusstvennogo soderzhaniya" [Early Gametogenesis of *Coregonus* Whitefishes in Artificial Conditions]. Cand. Sci. (Biol.) diss. abstract. Moscow: VNIRO.
3. Lebedeva O. A. 1976. "Sravnitel'naya kharakteristika rannego ontogeneza sigovykh ryb" [Comparative Characteristics of Early Ontogeny of Whitefish]. In: Priroda i khozyaystvennoye ispol'zovaniye ozer Severo-Zapada Russkoy ravniny, pp. 30-57. Leningrad: LPTI.
4. Litvinenko A. I., Kapustina Ya. A., Matkovskiy A. K., Semenchenko S. M. 2016. "Sovremennoye sostoyaniye i problemy vosstanovleniya zapasov sigovykh ryb Ob'-Irtyshskogo basseyna" [The Current State and Problems of Restoring the Stocks of Whitefish in the Ob-Irtysh Basin]. Proceedings of the 9th International Research and Practical Convention "Biologiya, biotekhnika razvedeniya i sostoyaniye zapasov sigovykh ryb" [Biology, Breeding Biotechnology, and the State of Stocks of Whitefish], pp. 57-60. Tyumen.
5. Mikodina E. V. et al. 2009. Gistologiya dlya ikhtiologov: opyt i sovety [Histology for Ichthyologists: Experience and Advice]. Moscow: VNIRO.
6. Persov G. M. 1975. Differentsirovka pola u ryb [Differentiation of Sex in Fish]. Leningrad: LGU.
7. Romeys B. 1953. Mikroskopicheskaya tekhnika [Microscopic Technology]. Moscow: Izd-vo inostrannoy literatury.
8. Selyukov A. G. 2007. Morfofunktsional'nyy status ryb Ob'-Irtyshskogo basseyna v sovremennykh usloviyakh [Morphofunctional Status of Fish of the Ob-Irtysh Basin in Modern Conditions]. Tyumen: University of Tyumen.
9. Selyukov A. G., Kibalova M. V., Mikhalenko E. V., Bogdanova V. A. 2016. "Formirovaniye fonda germinativnykh stvolovykh kletok v embriogeneze sigov baltiyskogo basseyna" [The Fund of the Germinative Stem Cells Formation in the Embryogenesis of Baltic Sea Basin Whitefishes]. Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 2, no 4, pp. 68-81. DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-4-68-81

10. Extavour C. G. M. 2007. “Evolution of the Bilaterian Germ Line: Lineage Origin and Modulation of Specification Mechanisms”. Integrative and Comparative Biology, Symposium “Key Transitions in Animal Evolution”, pp. 1-16. Oxford: Oxford University Press. DOI: 10.1093/icb/icm027
11. Kobayashi T. 2010. “In Vitro Germ Cell Differentiation During Sex Differentiation in a Teleost Fish”. The International Journal of Developmental Biology, vol. 54, pp. 105-111. DOI: 10.1387/ijdb.082836tk
12. Kurokawa H., Saito D., Nakamura S. et al. 2007. “Germ Cells Are Essential for Sexual Dimorphism in the Medaka Gonad”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104, no 43, pp. 16958-16963. DOI: 10.1073/pnas.0609932104