ОТЗЫВ

на диссертацию Олега Владимировича Зеленникова «Влияние процессов раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у рыб на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.06 – ихтиология

Диссертационная работа Олега Владимировича Зеленникова является достойным продолжением основного научного направления кафедры ихтиологии и гидробиологии Санкт-Петербургского государственного университета − исследования гаметогенеза у рыб. Созданное в 50-е годы прошлого века Н.Л. Гербильским, оно успешно развивалось такими выдающимися учеными как Г.М. Персов, Л.С. Краюшкина, И.А. Баранникова и Д.А. Чмилевский. Но даже среди этих обширных и разнообразных исследований О.В. Зеленникову удалось найти свое новое направление − изучение гонадо- и гаметогенеза у молоди и детерминации в раннем возрасте дефинитивных параметров воспроизводительной системы у круглоротых и рыб. С этим направлением неразрывно связана и цель проведенного 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. Необходимо подчеркнуть большое значение данного исследования не только для разработки теоретических основ процессов раннего онтогенеза рыб, но в первую очередь для решения рыбохозяйственных прикладных задач.

В последние 30 лет в литературе происходило накопление сведений о значении процессов раннего гонадо- и гаметогенеза для становления возраста полового созревания, величины плодовитости и соотношения полов у взрослых рыб. Но изучение этих проблем происходило неравномерно. Так, наиболее востребованной оказалась тема инверсии пола, а исследования других направлений развивались гораздо медленнее, часто в основном в работах О.В. Зеленникова. Диссертантом впервые всесторонне разработана проблема развития гонад и гамет в период от начала формирования гоний и дифференцировки пола до периода превителлогенеза. Наибольший вклад внесен им в изучение процессов реверсии пола у моноциклических лососевых. Показана динамика эстрадиола и тестостерона в процессе формирования унитарного фонда ооцитов периода превителлогенеза у моноцикличных лососевых и возможность стимулировать развитие дополнительного числа половых клеток у них на разных этапах раннего онтогенеза. Установлено, что увеличение числа половых клеток у самок полицикличных рыб может быть стимулировано гормональным воздействием или содержанием рыб при воздействии высокой токсичности. У

молоди кеты продемонстрирована периодизация развития яичников при 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.

Все результаты собственных исследований диссертанта наряду с анализом данных других авторов послужили для создания капитального обобщения, в котором не только рассмотрены различные аспекты становления плодовитости, но и выявлены перспективные для дальнейшей разработки проблемы дифференцировки и инверсии пола, анализа влияния токсических соединений и естественных факторов в экстремальном проявлении.

Вместо отдельной главы с обзором литературы диссертант поместил подробный обзор предыдущих исследований в начало каждой главы. Лидером здесь является глава 4, где целых четыре раздела посвящены литобзору по проблеме влияния закисления воды на репродуктивную функцию рыб.

В главе 1 О.В. Зеленников приводит характеристику исследованного материала и использованных им методов исследования, из которых большое внимание уделялось статистической обработке, существенно повышающей степень достоверности научных положений. Диссертационное исследование проведено на большом числе видов (15), включающих не только костистых рыб, но и круглоротых: речная и ручьевая миноги. Костистые рыбы изучены в широком диапазоне от осетровых (русский осетр) до цихловых (мозамбикская тиляпия). Но основной объем изученного материала состоит из представителей семейства лососевых. Все материалы диссертации получены диссертантом лично в ходе лабораторных экспериментов, работы на рыболовных заводах, а также при проведении экспедиционных исследований. Необходимо подчеркнуть, что выполненное диссертантом большое число экспериментов (47 вариантов 27 экспериментов) на 7 видах различных систематических групп, исследование в процессе работы более 9000 особей, применение разнообразных методик фиксации и обработки гистологических препаратов (до 200 для одной особи) и оценки состояния гонад не только придают выводам исследования высокую степень достоверности и обоснованность, но и вызывают искреннее восхищение. В отдельном разделе рассмотрены теоретические аспекты исследования фонда ооцитов в раннем онтогенезе и обсуждены вопросы классификации процессов раннего онтогенеза гонадо- и гаметогенеза и их терминологии.

В главе 2 приведены результаты изучения естественной и индуцированной реверсии пола у моноцикличных и полицикличных рыб. В качестве основного модельного вида для исследования процесса инверсии в дифференцировке пола у рыб диссертантом была

выбрана горбуша. У молоди этого вида и реципрокных гибридов горбуши и симы было прослежено развитие гонад, возникновение и завершение инверсии пола у самцов, влияние на этот процесс повышения температуры, воздействия гормонов тестостерона и эстрадиола. Диссертантом сделано заключение, что тотальная феминизация гонад и дальнейшая реверсия пола у рыб передается по женской линии. Показано, что как в естественных условиях, так и при относительно повышенной постоянной температуре половая дифференцировка гонад у молоди горбуши осуществляется сходным образом, а инверсия пола у генотипических самцов полностью завершается в период экзогенного питания молоди и не ранее появления в гонадах превителлогенных ооцитов. Установлено, что ооциты в гонадах генотипических самцов являются потенциально жизнеспособными, применение экзогенного эстрадиола предотвращает их резорбцию и со временем у всех особей происходит развитие обычных яичников.

Помимо горбуши инверсия пола была установлена у 2 других видов рыб, далеко друг от друга расположенных систематических групп, но также представляющих собой ювенильных протогинических гермафродитов: ручьевой миноги *Lampetra planeri* и *Danio rerio*. Диссертантом выявлено, что у самцов всех видов естественная инверсия пола завершалась не раньше, чем в гонадах всех особей появлялись ооциты периода превителлогенеза. При этом у самцов миноги, как и у самцов горбуши стероидсекреторные клетки при наличии ооцитов периода превителлогенеза не выявлялись в их оболочках. Обоснован вывод, что не только у самцов горбуши, но и у самцов других видов, для которых характерна естественная смена пола, полноценное вступление ооцитов периода ранней профазы мейоза в превителлогенез оказывается невозможен.

Кроме ювенильных протогинических гермафродитов формирование фонда ооцитов у мужских особей под воздействием эстрадиола было прослежено у самцов кеты и кижуча – двух видов из рода Oncorhynchus, для которых естественная инверсия пола не свойственна.

По уровню организации изложенного материала, разработки отдельных положений и обоснованности основных положений заключения глава 2 представляет собой одну из лучших в диссертации.

В главе 3 рассматривается формирование фонда половых клаток у молоди круглоротых и рыб при становлении цикличности воспроизводства. Диссертантом показана прямая зависимость становления абсолютной плодовитости, а также порционности нереста от процессов формирования, пополнения и расходования фонда ооцитов периода превителлогенеза, которые ранее не становились темой специального

исследования, а сама проблема остаётся наименее изученной в репродуктивной биологии рыб. Исследование выполнено на примере радужной форели. Установлено, что формирование фонда ооцитов периода превителлогенеза у полициклической радужной форели носит выраженный волновой характер.

Проведено сравнение с миногми и дальневосточными лососями (горбуша, кета, нерка, сима, чавыча, кижуч), у которых формируется единственная генерация ооцитов периода превителлогенеза, скоррелированная с абсолютной плодовитостью. Установлено, что после формирования старшей генерации ооцитов последующие появляющиеся гонии и ооциты периода мейоза или начала превителлогенеза подвергаются резорбции. Эти процессы происходят на фоне относительного снижения эстрадиола, и при введении этого гормона с кормом удалось предотвратить резорбцию части отолитов начала периода превителлогенеза и добиться увеличения их фонда у подопытных рыб.

Глава 4 посвящена влиянию различных факторов на формирование фонда половых клеток у молоди рыб. Исследовано влияние закисления, понижения температуры и введение гормонов на формирование и темп развития ооцитов на разных стадиях раннего онтогенеза. Модельными объектами для оценки влияния кислотного воздействия были выбраны тихоокеанский лосось горбуша и мозамбикская тиляпия. Первоначально была также исследована контрольная и подопытная молодь русского осетра, зафиксированная через 30 сут после окончания кислотного воздействия. Делается вывод, что кислотное воздействие до вступления половых клеток в период превителлогенеза оказало не негативное, а скорее стимулирующее влияние на развитие яичников и формирование старшей генерации ооцитов у исследованных видов, и что можно говорить не только о компенсации последствий кислотного воздействия у подопытных рыб, но и о стимуляции у них темпа развития яичников после его прекращения. Если после наступления периода превителлогенеза кислотное воздействие сохраняется, это приводит к ликвидации избыточного и сокращению исходного числа половых клеток.

Кета была использована как экспериментальный объект при оценке воздействия низкой температуры на развитие гонад на ранних этапах онтогенеза. Было установлено, что после перемещения зародышей и личинок кеты в воду с пониженной температурой, их рост практически прекращался. После завершения воздействия темп роста подопытных рыб восстанавливался, однако дефицит массы тела, возникший в ходе воздействия, не компенсировался. Изменению массы тела соответствовало изменение массы яичников. Вместе с тем, состояние фонда половых клеток у контрольных и подопытных рыб оказалось практически одинаковым. У всех рыб в гонадах присутствовала генерация сходных по размеру ооцитов периода превителлогенеза. Сделан вывод, что

кратковременные температурные манипуляции не отражаются на развитии фонда ооцитов у молоди кеты, даже если приводят к замедлению темпа роста рыб.

Серия экспериментов, проведенных для оценки воздействия экзогенного эстрадиола на темп роста, массу подопытных рыб, число и диаметр ооцитов периода превителлогенеза в яичниках самок горбуши, показала, что гормональная обработка ооцитов периода превителлогенеза не повлияла на темп роста подопытных рыб. Однако гормональное воздействие привело к увеличению числа ооцитов периода превителлогенеза в яичниках самок горбуши, в результате чего объем половых желез у подопытных рыб был во всех случаях больше, чем у контрольных. При этом следует подчеркнуть, что увеличение объема гонад было обеспечено не только за счет увеличения числа ооцитов, но и за счет их более быстрого роста. Когда на рыб начинали воздействовать уже после того, как в их гонадах формировалась генерация ооцитов периода превителлогенеза, воздействие эстрадиол-дипропионата не оказало заметного влияния на развитие гонад у самок – число половых клеток и диаметр ооцитов старшей генерации не отличались от таковых у контрольных рыб, дополнительного увеличения фонда гониев также не наблюдали.

Подводя итоги этой главы, диссертант делает заключение, что два фактора весьма различной природы – кислотное и гормональное воздействие – оказали на развитие фонда ооцитов у молоди рыб сходное влияние. При этом пониженная температура воды не оказывала влияние на формирование репродуктивного фонда у самок, независимо от состояния половых желез в момент воздействия.

В качестве замечания к главе 4 следует указать, что в литобзоре диссертант большое внимание уделяет воздействию рентгеновского облучения на развитие гонад у рыб, в том числе и молоди. При всем уважении в этим работам петербургской школы представляется неоправданным их подробное описание в литературном обзоре, поскольку сам диссертант не исследовал эту проблему. Было бы достаточным сравнить результаты различных негативных воздействий при обсуждении результатов.

Глава 5 посвящена анализу связи между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей. Диссертантом анализируется возможная взаимосвязь темпа роста мейоцитов и ооцитов периода превителлогенеза с последующим ходом их развития у рыб, а, в конечном счете, с возрастом полового созревания. Объектом исследования послужила молодь кеты, выращенная в условиях рыбоводных заводов, а также в лабораторных условиях при относительно высокой температуре. О.В. Зеленниковым установлено, что чем при более низкой температуре проходит развитие рыб, тем меньшую сумму градусо-дней они набирают за период от начала дифференцировки пола или от того момента, когда в

яичниках появляются мейоциты до перехода этих клеток в период превителлогенеза, и тем позже начинается этот рост. Диссертант предполагает, что именно разный темп гаметогенеза в период постэмбрионального развития в разных температурных условиях определяет принципиальные различия состояния яичников у молоди на разных заводах при сходной массе тела. Показано, что 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. Им также высказано предположение, что у разных рыб изначально проявляется разный темп оогенеза, который и определяет их половое созревание в разном возрасте. Именно это и происходит у лососей с длительным периодом речного развития. При этом на тех заводах,где среди производителей преобладают особи старших возрастных групп 4+ − 6+ выпускают мальков с наименее развитыми яичниками, а более развитые гонады характерны для мальков, где основу промыслового стада составляют молодые особи в возрасте 2+ − 3+.

При изучении раннего гаметогенеза молоди горбуши в условиях рыбоводных заводов диссертантом было установлено, что площадь яичников на поперечных срезах и диаметр ооцитов, как и в случае с кетой, не были связаны с темпом роста рыб. Состояние гонад у молоди горбуши перед выпуском с заводов при современной биотехнике ее выращивания оказалось сходным. Фактически у всех самок уже была сформирована старшая и, фактически, единственная генерация ооцитов периода превителлогенеза. В дальнейшем, по мере роста рыб пополнение численности этой генерации не происходило, и только рост ооцитов определял увеличение объема гонад.

Открытием диссертанта можно считать обнаружение обратной реверсии: у самок с наиболее выраженным асинхронным оогенезом со временем в гонадах появляются сначала сперматогонии, а впоследствии и оформленные в цисты сперматоциты. При этом постепенно доля генеративной ткани, занятая женскими половыми клетками сокращается, а мужскими – возрастает. Таким образом, фактически, мы наблюдаем еще один вид инверсии пола. Причем, в отличие от обычных самцов того же поколения, у таких рыб можно видеть активный сперматогенез. Не исключено, что это явление может быть связано с появлением хорошо известных для горбуши «джеков» – самцов, которые возвращаются в реки на нерест после 3-4 месяцев жизни в море. Это уникально редкое явление. Диссертант допускает возможность, что именно с такими особями связано появление гермафродитов у тихоокеанских лососей.

О.В. Зеленниковым исследовалась также проблема соотношения полов у молоди горбуши. Всего к анализу в данной работе были привлечены выборки численностью не менее 100 экз., в которых пол был определен у 7710 особей. Обнаруженное в ходе

исследования преобладание самцов диссертант представляет естественным для горбуши, у которой, в отличие от лососевых рыб с длительным периодом развития, нет карликовых самцов и при известной биологической закономерности пониженной жизнестойкости мужских особей, способствует выравниванию доли самцов и самок у горбуши в период морского нагула.

Исследовав заводскую и природную молодь кеты и горбуши, О.В. Зеленников дает следующее заключение. В выборках одновозрастных заводских рыб обоих видов репродуктивные показатели и величина диаметра ооцитов не зависели от массы и длины самок. То же было установлено и при исследовании «дикой» молоди горбуши, выборки которой, очевидно, составили одновозрастные особи. В отличие от этого, у молоди кеты естественного происхождения такая зависимость была налицо, причем без всяких исключений. Отмечается, что в отличие от горбуши, у выловленной позднее молоди кеты в каждой реке увеличивались и площадь гонад, и диаметр ооцитов. По совокупности полученных фактов делается заключение, что выборки единовременно пойманных самок кеты составили не только разноразмерные, но главным образом разновозрастные особи.

В главе 6 О.В. Зеленников анализирует связь между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей у лососевых рыб. Прослежено развитие гонад радужной форели при выращивании в температурном режиме 15-17 и 19-20°С, а также выращенных в условиях северо-запада кумжи каспийской попцляции и атлантического лосося онежской популяции. При обобщении полученных данных радужной форели предполагается, что температурный режим 15-17°С был, по всей видимости, наиболее благоприятным для гаметогенеза молоди радужной форели. Для самок радужной форели одного поколения как при сравнительно низкой, относительно оптимальной, так и при сравнительно высокой температуре естественным является достижение полового созревания в течение, по крайней мере, двух лет. Тем не менее, даже, казалось бы, при практически единовременном созревании могут оказаться самки с индивидуально замедленным темпом оогенеза и поэтому пропускающие нерестовый сезон. Вместе с тем, повышая температуру воды при содержании форели в условиях рыбоводных хозяйств, можно добиться увеличения доли особей, достигающих половой зрелости в первый для данного поколения нерестовый сезон. Оптимизируя же температурный режим, можно добиться единовременного созревания большинства самок форели.

У каспийского лосося при выращивании в условиях селекционно-генетического центра рыбоводства «Ропша» сохранились видовые особенности развития гонад, присущие им в естественном ареале. При этом как самки, так и самцы достигали полового

созревания при сравнительно небольшой массе, как это и характерно для лососёвых рыб при исключении морского периода жизни. Неожиданным представляется диссертанту сравнительно высокий темп оогенеза у каспийской кумжи и половое созревание самок в возрасте 3+, а также специфика развития самцов, созревших в более раннем возрасте.

Установлено, что самки и самцы онежского, как и каспийского лососей достигали полового созревания при сравнительно небольших размерах, что в принципе известно для разных видов лососевых рыб при исключении морского периода развития, в том числе при создании маточных стад.

Для всех исследованных видов делается вывод, что для каждого вида лососевых рыб можно создать максимально комфортные условия, при которых производители, достилающие в естественных условиях полового созревания в течение нескольких лет, созреют в один год. При этом разделение генерации одновозрастных рыб на особей достигающих полового созревания в разные годы, происходит в период превителлогенного роста у самок. Диссертантом установлено, что при одновременном созревании самок период вителлогенеза оказывается более длительным, чем период превителлогенеза. При половом созревании части особей продолжительность периода вителлогенеза сокращалась. Половое созревание самцов у всех видов опережало половое созревание самок.

Глава 7 посвящена процессу резорбции ооцитов периода превителлогенеза в раннем онтогенезе круглоротых и рыб. Диссертант рассматривает различные состояния ооцитов, которые были описаны ранее как находящиеся в состоянии резорбции. В их первую группу попадают нормальные ооциты, подвергшиеся сжатию в результате фиксации и последующей гистологической обработки.

В опытах по сублетальному кислотному воздействию диссертантом установлено, что оно не привело к нарастанию спонтанно и вяло идущей резорбции некоторой части превителлогенных ооцитов. Их крайне редкая встречаемость позволяет предположить, что отдельные половые клетки нежизнеспособны изначально, и их резорбция не связана с кислотным воздействием. Факторы, определяющие их нежизнеспособность, могли иметь генетическую природу, а внешнее воздействие и связанный с ним энергетический дефицит ускорили процесс их деструкции.

Вместе с тем, в развитии рыб есть варианты, когда именно массовая резорбция ооцитов периода превителлогенеза является обычным явлением и сомнений не вызывает. Первый вариант этого явления хорошо известен для ряда видов непаразитических миног. Это массовая резорбция превителлогенных ооцитов как начальный этап формирования величины абсолютной плодовитости.

Второй вариант – массовая резорбция превителлогенных ооцитов как механизм сокращения числа особей у вида с циклической динамикой численности. Это было показано для дальневосточной сардины, или сардины-иваси.

В главе 8 приводится общее заключение о влиянии раннего онтогенеза на развитие воспроизводительной системы круглоротых и рыб. Она обобщает ранее установленные в работе закономерности.

Замечания по тексту диссертации:

1. В общей характеристике работы диссертант несколько упрощенно оценивает факторы становления ихтиологии как науки лишь в форме совершенствования и увеличения масштабов промысла и развития разных форм аквакультуры. Очевидно, что круг этих факторов значительно шире.
2. В качестве ближайших родственников горбуши указаны кета и нерка. При этом сведения о близком родстве этих видов взяты из довольно давних работ Царева и др. (1984) и Чернова и Борксениус (1989). Однако с 1989 года появилось большое число исследований родственных отношений тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*, которыми можно было бы дополнить данный список работ. Для примера можно привести моногрфию Животовского (2015).
3. В основном диссертация написана хорошим языком, почти без ошибок. Вместе с тем отдельные главы сделаны сумбурно, в них отмечаются перескоки с описания развития гонад одного вида на другой в целях сравнения, что в итоге загромождает описание. По-видимому, огромный объем выполненной работы не всегда удавалось поместить в традиционные рамки структурирования.

Диссертация изложена на 367 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 глав, 11 выводов и списка литературы. Работа содержит 40 таблиц, 31 график и схему, а также 216 микрофотографий. Список цитированной литературы включает 808 наименований. Особо следует отметить прекрасное качество микрофотографий, на которых легко проследить все описываемые в работе преобразования гонад.

По теме диссертации подготовлено 118 публикаций – 68 статей и 50 тезисов. Из них 43 статьи опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, из которых 11 опубликованы в изданиях Scopus и Web of Science.

Название диссертации отражает ее содержание. Структура и выводы автореферата в основном соответствует структуре и выводам диссертации.

Диссертация О.В. Зеленникова представляет собой выдающееся научное достижение, вносящее значительный вклад в разработку теоретических основ

онтогенетического развития рыб, а также в развитие рыборазведения лососевых рыб, и может быть опубликована как отдельная монография.

Диссертационная работа О.В. Зеленникова по специальности 03.02.06 – ихтиология по содержанию, актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и значению полученных результатов соответствует критериям п. 9, выдвигаемым «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748) и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, **Олег Владимирович Зеленников**, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.06 – ихтиология.

Официальный оппонент:

И.о. руководителя лаборатории ихтиологии ЗИН

Главный научный сотрудник

Доктор биологических наук

Специальность 03.02.06 – ихтиология

Без ученого звания

Воскобойникова Ольга Степановна

26.04.2021 О.С. Воскобойникова

Сведения об организации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ЗИН РАН)

199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, дом 1

Тел.: (812) 328-03-11

E-mail: admin@zin.ru, office@zin.ru,

WWW: http://www.zin.ru

Подпись руки Воскобойниковой ОС

удостоверяется

Ученый секретарь