

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной и инновационной
деятельности Национального исследовательского
Томского государственного университета,
доктор физико-математических наук, профессор

Ворожцов Александр Борисович

«_____» апреля 2021 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Зеленикова Олега Владимировича «Влияние процессов раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у рыб», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.06 – Ихтиология

Актуальность исследований. Исследования процессов воспроизводства и раннего развития эмбрионов, личинок и молоди рыб всегда были в центре внимания отечественной ихтиологической науки. Подавляющее большинство работ в этом направлении было выполнено на сравнительно взрослых особях – половозрелых или близких к половому созреванию. Сферой интересов О. В. Зеленикова явилось изучение влияния процессов раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у рыбообразных и рыб, что особенно выделяет ее на фоне других аналогичных исследований, поскольку этому направлению пока посвящено немногочисленные публикации как внутри страны, так и за рубежом. Соискателем представлены результаты многолетних (с 1997 по 2019 гг.) исследований, что делает работу основательной и актуальной.

Научная новизна. Автором 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.

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.

Обнаружено, что увеличение числа половых клеток у самок полициклических рыб может быть стимулировано гормональным воздействием или содержанием рыб при умеренной токсичности.

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.

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.

Полученные автором данные по выращиванию каспийской кумжи и онежской формы атлантического лосося в ходе формирования маточных стад этих видов способствовали совершенствованию биотехники их заводского выращивания.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 371 странице машинописного текста, состоит из введения, 8 глав, выводов и списка литературы. Работа содержит 41 таблицу, 31 рисунок, включающий, в том числе 249 микрофотографий. Список литературы состоит из 812 публикаций как отечественных, так и зарубежных (43 %) авторов.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность и степень разработанности темы. По мнению О. В. Зеленикова, воспроизводительная система у рыб изучена крайне неравномерно. Подавляющее большинство работ в этом направлении выполнено на сравнительно взрослых особях. Исследованию гонадо- и гаметогенеза у молоди рыб посвящалось и посвящается до настоящего времени несоизмеримо меньше работ. При выраженном преобладании работ, посвященных анализу дифференцировки пола, всем остальным аспектам функционирования репродуктивной системы у молоди рыб уделялось значительно меньше внимания. Их разработке и посвящена представленная диссертация.

Глава 1. «Материалы и методы исследования» (С. 17–32). Материалы, представленные в диссертации, были получены автором при работе с разновозрастными особями 15 видов круглоротых и рыб: речной и ручьевой

миноги, русского осетра, дальневосточной сардины, радужной форели, атлантического лосося онежской популяции, каспийского лосося, шести видов тихоокеанских лососей – горбуши, кеты, нерки, кижуч, чавычи и симы, тропических рыб – данио рерио и мозамбикской тиляпии. Часть материалов были получены в ходе проведения лабораторных экспериментов, преимущественно в лаборатории экспериментальной ихтиологии Санкт-Петербургского государственного университета. Рыб получали на рыбоводных заводах, отбирали из промысловых уловов и отлавливали в естественной среде. Большинство всех материалов, взятых на рыбоводных предприятиях и в естественной среде, было собрано на территории Сахалинской области. В главе представлена программа экспериментальных работ. Подготовка проб и гистологическая обработка проводилась согласно общепринятым методикам (Роскин, Левинсон, 1957; Микодина и др., 2009). Предметом исследования в работе явились 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. Количественный анализ, по замечанию автора, представлен в работе преимущественно в табличном варианте, однако ссылок на использование в диссертационном исследовании пособий по использования методов математической статистики не указано. Не ясно и помещение в подглаву 1.6 предполагаемого обсуждения и вопросов терминологии, которого в итоге здесь нет.

Глава 2. «Развитие фонда половых клеток у молоди круглоротых и рыб в связи с естественной и индуцированной инверсией пола» (С. 33–88). Здесь на основе обширного опубликованного ранее материала автором рассматриваются современные взгляды на вопросы дифференцировки и инверсии пола у рыб. В разделе 2.2 «Гистологический и ультраструктурный анализ развития фонда половых клеток в ходе дифференцировки пола у ювенильных протогинических гермафродитов круглоротых и рыб» на основе анализа состояния гонад у молоди *горбуши* (основной объект исследования), симы, их гибридов, *данио рерио* и *ручьевой миноги* представлены собственные наблюдения автора. Автор констатирует, что и само анатомическое строение яичников у трех этих видов принципиально различается (непарная железа открытого типа у миноги; парная железа открытого типа у горбуши и парная железа закрытого типа у данио рерио). Однако все эти три вида, по заключению О.В. Зеленникова, со столь различным характером и особенностью репродуктивного периода в известном смысле оказались совершенно одинаковыми. 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. В разделе 2.3. «Экспериментальный подход к исследованию онтогенетических, цитологических и эндокринных аспектов инверсии пола» установлено, что воздействие эстрадиола на самцов горбуши при любом исходном состоянии гонад стимулировало у них оогенез во всех экспериментах. Гормональное воздействие останавливало инверсию пола на том этапе, на котором заставало этот процесс. Установлено, что инверсия пола у молоди горбуши при любом температурном режиме завершается в период эмбрионально-личиночного развития. Развитие фонда ооцитов у самцов рыб при индуцированной инверсии пола было исследовано автором у самцов кеты и кижуча – двух видов из рода тихоокеанских лососей, для которых естественная инверсия пола, в отличие от горбуши, не свойственна. По совокупности полученных данных автор сделал заключение, что феминизация гонад у самцов круглоротых и рыб – ювенильных протогинических гермафродитов может осуществляться на разном этапе онтогенеза – в период эмбрионального, личиночного или малькового развития. При этом естественная инверсия пола у всех видов завершается не раньше, чем в их яичниках появятся ооциты периода превителлогенеза.

Глава 3. «Формирование фонда половых клеток у молоди круглоротых и рыб при становлении цикличности воспроизводства» (С. 89–142). Здесь предметом изучения О. В. Зеленникова явилось становление абсолютной плодовитости рыб, а также порционности нереста, которые являются основной составной частью процессов формирования, пополнения и расходования фонда ооцитов периода превителлогенеза. В свою очередь, исследуя особенности формирования фонда ооцитов у рыб при воздействии различных факторов, автор выявил весьма различное состояние фонда ооцитов у одновозрастных и одноразмерных особей, при этом выращиваемых совместно в одинаковых условиях. Для работы и особенно для обсуждения проблемы становления цикличности воспроизводства в онтогенезе была выбрана радужная форель, которая, по мнению автора, является чрезвычайно важным, фактически незаменимым модельным объектом. 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. На примере миног и тихоокеанских лососей как представителейmonoциклических круглоротых и рыб рассмотрено формирование фонда ооцитов у их молоди. При проведении гистоморфологического анализа состояния яичников у ручьевой миноги *Lampetra planeri* в течение полного репродуктивного цикла и в ходе анализа автором выявлены два периода выраженного асинхронного развития ооцитов, причем на качественно различных этапах развития гонад. Впервые были

выявлены ооциты периода превителлогенеза среди близких к дефинитивному состоянию ооцитов периода вителлогенеза незадолго до полового созревания. Сам факт присутствия таких клеток в гонаде свидетельствует, с точки зрения автора, о том, что асинхронное развитие ооцитов в яичниках у миноги возможно в течение нескольких лет. По итогам проведенного исследования, автор, выявив очевидное сходство в формировании фонда ооцитов у молоди тихоокеанских лососей (горбуша, кета, сима, нерка, кижуч, чавыча), обнаружил и некоторые различия. И главное из них предположительно зависимое от продолжительности периода полового созревания, которое связано с разным темпом роста ооцитов в онтогенезе рыб разных видов.

Глава 4. «Влияние различных факторов на формирование фонда половых клеток у молоди рыб» (С. 143–184). К настоящему времени в литературе накоплены многочисленные данные о том, что в условиях хронического или аварийного токсического воздействия у рыб наблюдаются в том числе нарушения в развитии органов, вовлеченных в работу воспроизводительной системы, о массовой резорбции половых клеток и сокращении плодовитости, об изменении темпа полового созревания и репродуктивного поведения. Однако до настоящего времени такие работы, применительно к рыбам, являются крайне малочисленными. В главе автор рассматривает влияния ряда факторов на воспроизводительную систему рыб: влияние закисления воды на формирование фонда ооцитов как в раннем, так и в последующем онтогенезе, влияние пониженной температуры на развитие гонад. Важнейшей задачей выполненных исследований был анализ отдалённых последствий кислотного воздействия. По результатам всех проведенных опытов автором было установлено, что в момент окончания сублетального кислотного воздействия число ооцитов периода превителлогенеза у подопытных рыб оказалось меньше, чем у контрольных. В результате проведенных работ было установлено, что два фактора весьма различной природы – кислотное и гормональное воздействия – оказали сходное влияние на развитие фонда ооцитов у молоди рыб. Пониженная температура воды в среднесрочной перспективе не оказала влияние на формирование репродуктивного фонда у самок, независимо от состояния половых желез в момент воздействия.

Глава 5. «Анализ связи между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей у лососей с коротким периодом жизни в реке» (С. 185–224). В главе рассматривается рост ооцитов и 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 была выбрана кета: как считает автор, на этом виде, как ни на каком другом, можно было бы

судить о возможной роли темпа роста ооцитов периода превителлогенеза в детерминации возраста полового созревания производителей. Дополнительно привлекались материалы по нерке и горбуше. Были получены интересные, в том числе и для целей рыбоводства с эти объектом данные о том, что состояние яичников у молоди кеты непосредственно перед выпуском с рыболовных заводов существенно различается, тесно связано с суммой градусо-дней, набранных молодью за время выращивания, но не зависит от массы самок, как в среднем на разных заводах, так и в партиях одновозрастных рыб на каждом предприятии.

Глава 6. «Анализ связи между темпом роста ооцитов периода превителлогенеза и возрастом полового созревания производителей у лососевых рыб» (С. 225–269). В главе рассмотрен гаметогенез радужной форели *Parasalmo mykiss* при различном температурном режиме, в том числе представлен литературный обзор по этой тематике. Здесь же рассмотрено выращивание радужной форели. В качестве условий был выбран температурный интервал от 15 до 17° С. Состояние яичников радужной форели, выращиваемой при температуре 15–17° С в течение до 21 месяца, когда рыбы достигли V стадии зрелости. Автор оперировал, за исключением данных по 8 месячным форелям, только малыми выборками (от 1 до 9 особей). Аналогичная ситуация имелась и по сборам самцов. Интервал между выборками составлял от 1,5 до 2 месяцев. Выращивание радужной форели при температуре 19–20° С. Исследования в новом температурном режиме привели автора к важному заключению: 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. Вместе с тем, повышая температуру воды при содержании форели в условиях рыболовных 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. Представлены исследования гонад у самок и самцов каспийского лосося и атлантического лосося онежской популяции.

Глава 7. «К вопросу о резорбции ооцитов периода превителлогенеза в раннем онтогенезе круглоротых и рыб» (с. 270–287). Основу главы составил обзор литературных источников с демонстрацией тех примеров собственных экспериментальных данных, подтверждающих выявленные ранее другими авторами морфологических изменений ооцитов. Здесь же представлены некоторые биологические характеристики дальневосточной сардины.

Глава 8. Влияние раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у круглоротых и рыб (с. 288–297) представляет собой заключение по материалам диссертации, которые в той или иной степени были представлены в

предыдущих главах и там же частично обсуждались. Проводится анализ полученных автором данных.

Выводы по представленной работе в целом соответствуют цели и задачам исследований.

Практическая значимость полученных результатов соискателем 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.

Научные работы соискателя, опубликованные в открытой печати, всего 118 работ, в том числе 43 в изданиях, рекомендованных ВАК, в полной мере отражают материалы диссертации, автореферат в целом соответствует содержанию диссертационной работы. Результаты исследований докладывались на многочисленных совещаниях и конференциях разного уровня.

К замечаниям к работе можно отнести следующее:

В диссертации имеется табличный материал и графика, для создания которых применялись методы математической статистики и многомерного анализа (рис. 2.13). К сожалению, автор в главе «Материалы и методы исследования» не раскрыл основные направления этой деятельности и не указал источники, которые он использовал для этого.

Рис. 1.1. «Схема опытов, в которых зародышам и личинкам горбуши делали инъекцию тестостерона-пропионата ... » представлен своеобразной графикой, и было бы не лишним дать к ней более подробное пояснение.

Рис. 2.13. (с. 73) «Дендрограммы сходства состояния гонад у личинок горбуши ... В представленном кластерном анализе даны 4 изображения под индексами А, Б, В, Г. Однако в пояснении к рисунку речь идет только о изображениях А и Б. Кроме того, желательно было назвать ось абсцисс и дать в примечании необходимы пояснения.

Имеются фрагменты текста (Гл. 3; с. 96), где необходимо было дать развернутые пояснения: *Общая численность ооцитов, определённая у пяти рыб, варьировала от 89,7 до 487,0 тыс. и в среднем составила 239,5 тыс. Таким образом, объём фонда превителлогенных ооцитов у самок форели в возрасте 20 мес. был в среднем в 9,5 раза больше, чем у самок в возрасте 10–12 мес.* К сожалению, выборка явно небольшая, а какие могут быть предположения относительно столь большого изменения этого показателя.

Работа написана хорошим языком, легко читается, однако имеются незначительные опечатки в тексте.

Заключение

Диссертация Зеленникова Олега Владимировича «Влияние процессов раннего оогенеза на развитие воспроизводительной системы у рыб», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук соответствует паспорту научной специальности 03.02.06 – Ихтиология, имеет теоретическое и практическое значение, соответствует требованиям п. 9–11, 13, 14 действующего «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к докторским диссертациям, и является научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение для рыбного хозяйства Российской Федерации, а сам автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры ихтиологии и гидробиологии Национального исследовательского Томского государственного университета, протокол № 4 от 26 апреля 2021 г.

Профессор кафедры ихтиологии и гидробиологии
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский
Томский государственный университет»
(634050, г. Томск, Ленина пр., 36; (3822) 52-98-52;
rector@tsu.ru; <http://www.tsu.ru>),
доктор биологических наук
(03.00.08 – Зоология),
профессор



Романов Владимир Иванович

27.04.2021