

На правах рукописи

БАЯНДИНА
Юлия Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА
ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА *SCORPHTHALMUS MAEOTICUS*
(PISCES, SCORPHTHALMIDAE)**

1.5.16 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ), в отделе аквакультуры и морской фармакологии и лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана.

Научный руководитель: Ханайченко Антонина Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник отдела аквакультуры и морской фармакологии ФИЦ ИнБЮМ, г. Севастополь

Официальные оппоненты:

Пономарёва Елена Николаевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая отделом водных биологических ресурсов бассейнов южных морей Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (ЮНЦ РАН) г. Ростов-на-Дону

Архипов Александр Геральдович – доктор биологических наук, профессор, научный координатор Атлантического филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (АтлантНИРО), г. Калининград

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН), г. Мурманск

Защита диссертации состоится 30 июня 2023 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.221.01 (Д900.009.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» наук по адресу: 299011, Россия, Севастополь, пр. Нахимова, 2; телефон: +7 (8692) 54-06-49; e-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» по адресу: 299011, РФ г. Севастополь, проспект Нахимова, 2, и на сайте по адресу: <https://ibss-ras.ru/science/dissertation-council-24-1-221-01/announcement/2023/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Поспелова Наталья Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Проблема естественного и искусственного воспроизводства рыб является одной из фундаментальных комплексных биологических и океанологических задач.

Нарушения экологического равновесия привели к снижению естественного воспроизводства рыб. Активный рост промышленного рыболовства в течение всего XX и в начале XXI века привел к тому, что у большинства ценных промысловых рыб ускорился темп полового созревания, снизились средние размеры, ускорился темп роста, в популяциях стали преобладать молодые особи (Куманцов, 2013, Гиригосов, 2015, Надолинский, 2018, Шляхов, 2019). В настоящий момент искусственное воспроизводство рыб является безусловной необходимостью.

Ценный промысловый вид рыб и перспективный объект марикультуры, черноморская камбала калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) (Scophthalmidae, Pisces), является одним из важных компонентов экосистемы Черного моря, так как в течение жизненного цикла входит в состав разных биоценозов: в планктон – от начала эмбриогенеза до окончания раннего личиночного развития, в нектон – до окончания эмбриогенеза, далее, в мальковый период развивается в прибрежных биоценозах и переходит в донные биоценозы шельфа во взрослом состоянии.

Эффективность воспроизводства рыб зависит от климатических, в частности, гидрологических условий, выживаемости и нормы развития икры и личинок, которые определяются качеством гамет, которые в свою очередь связаны с биологическими характеристиками производителей.

Физиологическое состояние производителей оказывает непосредственное влияние на качество половых продуктов и приводит к изменениям нерестового поведения рыб (Владимиров, 1965; Шульман, 1972; Brooks, 1997, Гиригосов, 2020). Обычно фенотип потомства определяется и генами матери, и генами отца, однако вклад материнского и отцовского фактора в развитие эмбрионов рыб различен. Материнский фактор, т.е. вклад в потомство, определяющий качество икры, является продуктом как ядерно-генетического, так и внеядерного, негенетического материала (Chambers, 1996; Rideout, 2005; Kroll, 2013). Для калкана известно, что низкая вариабельность размера икринок, полученных от одной самки, повышает вероятность нормального развития эмбрионов (Битюкова, 1998). Существует ограниченное количество исследований, показывающих, что отцовский фактор, а именно качество спермы, влияет на морфологию и выживаемость потомства в течение раннего онтогенеза рыб (Ottesen, 2007; Benini, 2018). Вариабельность показателя оплодотворения положительно коррелирует со скоростью движения сперматозоидов и продолжительностью активности спермы после активации (Гинзбург, 1968; Holt, Van Look, 2004; Cosson, 2008, 2019). При применении разных методов активации и оценки спермы атлантического тюрбо (родственного черноморскому калкану) разными авторами были получены различные данные по продолжительности активности сперматозоидов: от 1 мин (Chauvaud, 1995); 10 мин (Suquet, 1995; Dreanno, 1999) до 40 мин (Gosz, 2011).

Характеристики спермы черноморского калкана и влияние биологических характеристик самцов на ее качество ранее изучены не были; влияние «родительского»

(материнского и отцовского) фактора на характеристики и выживаемость на ранних стадиях онтогенеза практически не изучены.

Отклонения от оптимальных гидрологических условий инкубации рыб могут оказывать повреждающее действие на эмбрионы и повышать их смертность. Влияние солёности и температуры на развитие черноморского калкана на ранних этапах онтогенеза в море и в экспериментальных условиях изучали ранее В. П. Попова (1975), А. Д. Гордина (1987, 1999), Ю. Е. Битюкова (1982, 1989, 1998). Было определено, что в процессе эмбриогенеза меняется термочувствительность эмбрионов калкана (Битюкова, 1982) и тюрбо (Gibson, 1995). Толерантность к пониженным температурам в начале эмбриогенеза у калкана оказалась выше, чем на этапах от завершения гастрюляции до вылупления. Нижняя граница оптимальной температуры воды для успешного эмбриогенеза калкана находится в пределах 8–12 °С, а верхняя граница температуры для всех этапов составляет 18 °С (Битюкова, 1982). Однако, различия температурного оптимума развития и выживаемости эмбрионов калкана, полученных в результате скрещиваний от разных производителей из нерестовых стад в разные фазы нерестового сезона (от апреля до июня), не установлены.

При выращивании рыб в искусственных условиях на выживаемость икры и личинок оказывает влияние гидродинамика в инкубаторах (поток воздуха и направление циркуляции воды). Оптимальные уровни продувки воздухом, формирующие разный уровень турбулентности воды в экспериментальных аквариумах, различны для разных видов рыб (Killgore, 1987; Gaignon, 1998; Li, 2018). В ряде экспериментов показано, что сильный уровень турбулентности (в результате продувки воздухом в искусственных условиях) приводит к гибели нежизнеспособных эмбрионов черноморского калкана на этапе вылупления (Маслова, 2013). Данные о размерных характеристиках, выживаемости эмбрионов и личинок при различных уровнях перемешивания для черноморского калкана отсутствуют.

Цель работы. Оценить влияние некоторых биотических и абиотических факторов на эффективность реализации нерестового потенциала черноморского калкана.

Для реализации цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

Оценить влияние родительского фактора (материнского и отцовского вклада, определяющего качество гамет и успешное развитие потомства) на выживаемость икры и характеристики личинок на выклеве и переходе на внешнее питание.

Установить наличие связей между биологическими характеристиками самцов и характеристиками подвижности их спермы.

Определить вариабельность характеристик спермы калкана из естественных популяций в различные годы и разные фазы нерестового периода, динамику изменения подвижности спермы в зависимости от времени после активации.

Разработать методику применения компьютерных технологий к исследованиям характеристик спермы калкана и апробировать её для исследования активности спермы калкана.

Определить влияние температуры на выживаемость и характеристики икры и ранних личинок, полученных в разные фазы нерестового периода.

Изучить влияние гидрологического режима на выживаемость икры, выживаемость и развитие личинок калкана.

Научная новизна полученных результатов. Разработан собственный экспериментальный протокол, модифицирована стандартная методика эксперимента (Павлов, 2006, Cosson, 2008, 2019) и анализа количественных и качественных (средние скорости движения, процент подвижных сперматозоидов и их концентрация в эякуляте) характеристик спермы с применением современных компьютерных технологий.

Впервые с использованием собственного экспериментального протокола, проведен мониторинг характеристик половых продуктов самцов черноморского калкана из естественных популяций юго-западного шельфа Крыма в течение нескольких нерестовых сезонов.

Установлен диапазон индивидуальных характеристик спермы черноморского калкана по таким показателям как: концентрация, скорость и доля подвижных сперматозоидов, продолжительность их активности.

Получены данные по длительности активности спермы отдельных самцов калкана (от 1 часа до 7 часов) после ее активации – максимальные среди камбалообразных рыб.

Впервые были определены различия термопреферендума эмбрионов калкана, полученных от разных производителей в разные фазы нерестового сезона.

Впервые для калкана определено влияние не только материнского, но и отцовского фактора на размерные характеристики личинок и их вариабельность, выживаемость на выклеве и при переходе на внешнее питание.

Выявлено, что на этапах эмбрионального развития наличие слабого барботажа является фактором, негативно влияющим на выживаемость эмбрионов, но выживаемость личинок от выклева до перехода на внешнее питание повышается.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящая работа является одной из составных частей комплексных исследований репродуктивного потенциала черноморского калкана из естественных популяций шельфа Крыма. Результаты исследования существенно дополняют данные о влиянии качества исходных родительских гамет на эффективность воспроизводства калкана в зависимости от комплекса абиотических факторов (температурных и гидрологических условий).

Данные могут быть использованы для: оценки состояния нерестового потенциала естественной популяции калкана; прогнозирования успешного скрещивания производителей калкана и жизнеспособности потомства в марикультурных хозяйствах; селекции производителей: экспресс-оценки качества половых продуктов; оценки характеристик спермы рыб и подвижности других объектов с помощью авторского плагина wrMTck_Batch.

Методы исследования. Использован прижизненный метод отбора половых продуктов у самок и самцов калкана, метод оплодотворения икры калкана, метод инкубирования эмбрионов и личинок калкана в искусственных условиях. Освоена методика измерения морфологических структур икры и личинок калкана. Освоен стандартный метод и разработана собственная модификация метода подготовки препарата спермы для видеорегистрации.

Модифицирована методика анализа характеристик подвижности спермы с применением современных компьютерных технологий.

Использованы методы компьютерного статистического анализа данных: корреляционный анализ, дисперсионный анализ ANOVA, метод главных компонент.

Положения, выносимые на защиту.

- Межгодовые среднестатистические показатели качества спермы (скорости и доли подвижных сперматозоидов) значимо варьируют, под влиянием разных экологических (абиотических и биотических) условий, в которых находятся нерестовые популяции черноморского калкана
- Длительность активности спермы самцов калкана после её активации превышает значения, зарегистрированные для других камбалообразных рыб.
- Коэффициент вариабельности размеров икринок калкана от одного скрещивания является одним из важных параметров качества икры.
- Разнокачественность раннего онтогенеза калкана определяется комплексом абиотических и биотических факторов, в том числе «материнским» и «отцовским» фактором.
- Термопреферендум эмбрионального развития калкана изменяется в течение нерестового сезона.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.16 – гидробиология, пункту 1: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях, с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)», а также пункту 7 паспорта «Разработка методов экологического мониторинга водных экосистем».

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена применением адекватного набора методов исследований, оригинальными схемами постановки экспериментов, достаточными объемами экспериментальных выборок (индивидуальные характеристики спермы были изучены по пробам от 142-х самцов калкана, проведен мониторинг развития 18 партий оплодотворенной икры и личинок калкана, прослежено развитие 35 тыс. эмбрионов), использованием необходимых методов и компьютерных программ статистической обработки массивов данных.

Апробация результатов работы: Результаты работы были представлены на отечественных и международных конференциях: V Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2007» (24–27 сентября 2007 г), II Международная ихтиологической научно-практической конференция (Севастополь, 16–19 сентября 2009 г.), VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2011» (24 – 27 мая 2011 г), VIII международная научно-практическая конференция по проблемам водных экосистем. PontusEuxinus 2013 1 – 4 октября 2013 г, X Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2017» по проблемам водных экосистем, в рамках проведения Года экологии в Российской Федерации, 17–20 ноября 2017 г., Севастополь, на Всероссийской научно-практической. конференции, г. Красно-дар, 17–19 мая 2018. Кубанский государственный университет, 2018г., XI Всероссийской онлайн-школы-семинара для молодых ученых, студентов и аспирантов, г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2020 г. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ. Международной научной конференции,

посвященной 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий» 13–18 сентября 2021 г., г. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ.

Личный вклад автора. Автором осуществлен анализ имеющейся информации по проблематике представленной диссертации и подготовлен обзор литературы. Им выполнены все виды экспериментальных работ, проведена статистическая обработка и графическое представление полученных результатов. Автором модифицирована и апробирована методика компьютерного анализа количественных и качественных характеристик спермы калкана. Автор принял непосредственное участие в анализе полученной информации, в подготовке рукописи диссертации и статей соответствующей тематики.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликованы 16 печатных работ, из них 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 3 статьи включены в базу WoS (Scopus), 3 статьи в сборнике научных трудов и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех разделов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Она изложена на 157 страницах, содержит 12 таблиц и 32 рисунка. Список литературы включает 155 источников, в том числе 98 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю, к.б. н. Антонине Николаевне Ханайченко, за помощь на протяжении всех этапов работы, а также ведущему сотруднику отдела аквакультуры и морской фармакологии ИнБЮМ к. б. н. Виталию Евгеньевичу Гиригосову за отбор и доставку проб спермы калкана, предоставленные данные по биоанализу самцов калкана и помощь в обсуждении материалов исследования.

Особую благодарность выражаю д. б. н. Юрию Николаевичу Токареву и профессору, д. б. н. Сергею Борисовичу Гулину за моральную поддержку и помощь в сложных жизненных и рабочих моментах во время написания рукописи диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Обзор литературы.

Проанализированы литературные данные по влиянию физиологического состояния самцов калкана на созревание и качество их спермы, по влиянию факторов внешней среды на способность к активации и подвижность их сперматозоидов. Рассмотрены основные современные методы определения качества спермы рыб.

Рассмотрены характеристики, определяющие качество икры и приведены литературные данные по влиянию температуры, солености воды и гидрологического режима на развитие и выживаемость эмбрионов и личинок калкана.

Исходя из анализа изученной литературы сделан вывод, что эффективность воспроизводства калкана в естественных и искусственных условиях зависит от комбинированного воздействия переменных гидрологических (температура, соленость, гидродинамические условия) и биологических параметров (качество родительских гамет, зависящее от физиологического состояния производителей) на стадиях онтогенеза до перехода на внешнее питание. Физиологическое состояние производителей оказывает

непосредственное влияние на качество половых продуктов и дальнейшее успешное эмбриональное развитие.

Материал и методы исследований.

Исследования проводили в течение 2007–2014 гг. на базе Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского.

Объектом исследования являлись: камбала калкан, сперма, эмбрионы и личинки калкана, полученные от разных производителей из естественных популяций.

С целью оценки состояния нерестовой популяции камбалы калкан 2007–2014 гг. исследовали размерно-возрастную и половую структуру, особенности репродуктивной биологии этого вида рыб по материалу, собранному на юго-западном шельфе Крымского полуострова. При проведении биологического анализа у рыб измеряли абсолютную (TL), стандартную (SL) длины и общую массу тела (Wt), измеряли массу тела без внутренностей (Ws), массу печени (W_L) и гонад (W_G), определяли пол и стадию зрелости. Гонадосоматический индекс (ГСИ) рассчитывали по формуле: $ГСИ = g \cdot 100 / W_s$. Морфометрический анализ выполняли по схеме, предложенной М. Карапетковой (1980).

Индивидуальные характеристики спермы были изучены по пробам 2007, 2008, 2010, 2012–2014 гг. полученным от 142 самцов калкана из естественной популяции. Для получения характеристик подвижности спермы производили видеозаписи мазка спермы после активации морской водой. Исследование характеристик спермы калкана в зависимости от степени разбавления морской водой проводили при разведении спермы морской водой в соотношении 1:10 и 1:100. Концентрацию сперматозоидов в эякуляте подсчитывали в камере Горяева. Анализировали видеозаписи с помощью модифицированной методики с использованием программы ImageJ.

Для установления наличия связей между размерно-возрастными и физиологическими характеристиками самцов и свойствами спермы были рассчитаны значения корреляций между такими характеристиками как: скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции, процент подвижных сперматозоидов, концентрация сперматозоидов, стандартная длина самца, соматический вес, вес печени и гонад.

Оценку выживаемости и развития личинок производили на выклев и каждые сутки до стадии перехода на внешнее питание после выклева. Выживаемость определяли методом ежедневного подсчета доли отхода икры (%) от момента посадки икры в инкубаторы вплоть до выклева личинок.

Для изучения влияния родительского фактора на параметры личинок до начала экзогенного питания проводили отдельные оплодотворения икры разных самок спермой разных самцов в нерестовый сезон 2007 г. при температуре инкубации 16,5 °С и в 2009 г при трех температурах 15, 18 и 21 °С. При оценке влияния «отцовского» эффекта использовали отдельные оплодотворения икры от одной самки спермой разных самцов 2007 г. и в 2009 г.

Для определения термопреферендума эмбрионов и личинок в течение нерестового сезона, их содержали при стабилизированной температуре 15, 18 и 21 °С. Нерестовый сезон был условно разделен на следующие периоды: с апреля по первые числа мая – начало сезона нереста; середина – конец мая – середина сезона; июнь – конец сезона.

Эксперименты развития и выживаемости икры и личинок при трех режимах

барботажа (без барботажа, слабая продувка (0,56 мл/сек), сильная продувка (1,25 мл/сек)) проводили при постоянной температуре 18 °С.

Всего проведен мониторинг развития 18 партий оплодотворенной икры и личинок калкана, в ходе экспериментов прослежено развитие около 35 тыс. эмбрионов и личинок. Морфологические измерения икры выполнены по двум признакам: диаметр икры (D), мкм, диаметр жировой капли (OD), мкм; личинок по трем: стандартная длина личинки (Sl), мкм, объем желточного мешка (VYS) мкм³, диаметр жировой капли (OD), мкм. Оценку выживаемости личинок производили на выклеве и на первые сутки после выклева по доле выживших личинок. Рост и развитие личинок оценивали по их стандартной длине (Sl, мкм), диаметру жировой капли (OD, мкм) и объему желточного мешка (VYS, мкл³). Для измерений использовали бинокляр МБС-10 при увеличении 8x4.

Методы статистической обработки данных

Статистический анализ данных проводили в программе программам MS Excel и STATISTICA 10. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($M \pm SD$).

Выборки данных были проверены на нормальность с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для сравнения достоверности различий выборок нормально распределенных данных использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Для данных, которые были распределены ненормально анализ различий между средними значениями проводили с помощью критерия Крускала–Уоллиса по рангам. Для оценки различий между двумя выборками использовали парные тесты U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Коэффициенты корреляции Пирсона использовали для изучения существующих взаимосвязей между биологическими характеристиками. Коэффициент корреляции Спирмена – между периодом нереста в разные годы и характеристикой подвижности сперматозоидов.

Для поиска возможной взаимосвязи переменных между биотическими и абиотическими факторами и показателями качества спермы калкана, провели разведочный анализ данных методом главных компонент.

Модификация компьютерного метода определения характеристик движения сперматозоидов рыб.

Для оптимизации процесса определения характеристик спермы разработали модификацию стандартного метода компьютерного анализа спермы рыб. В программу ImageJ установили плагин **wrMTrck_Batch**, (Nussbaum-Krammer *et al.*, 2015), который обрабатывает видеозаписи «пакетно» и автоматически сохраняет результаты для каждого файла отдельно в формате «txt».

Для обработки txt-файлов с данными, полученными плагином wrMTrck_Batch в ImageJ, и расчета по ним значений скоростей движения всех объектов в кадре, медиан и средних, доверительных интервалов, процента подвижных сперматозоидов в пробах были написаны макросы под Excel. Макрос для сбора txt-файлов для каждой пробы и макрос для сбора результатов в сводную таблицу по всем файлам.

Применение авторского алгоритма подсчета основных характеристик движения сперматозоидов с использованием плагина wrMTrck_Batch и написанных макросов позволяет значительно сократить время обработки начальных данных: на получение

сводной таблицы характеристик движения сперматозоидов в 405 пробах (около 2 000 нарезанных видеороликов) затрачивается не более 30 мин.

Результаты исследований и их обсуждение.

Вариабельность характеристик спермы камбалы калкана. Межгодовые вариации подвижности спермы самцов калкана рассмотрены на примере разных (2008, 2010, 2012–2014 гг.) нерестовых популяций калкана Севастопольского региона. Независимо от фазы и года нерестового периода активная сперма была зарегистрирована у 90 % самцов из числа «текучих». В среднем скорость сперматозоидов по криволинейной траектории (VCL) составила 100 ± 52 мкм/с. Такие скорости близки к скорости VCL для близкородственного вида камбалы – тюрбо – 220 мкм/с (Cosson, 2008; Dreanno, 1999) и палтуса 150–180 мкм/с (Billard, 1977).

Доля подвижных сперматозоидов в активированных черноморской водой индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана находилась в пределах от 30 до 99%.

Концентрация сперматозоидов в сперме варьировала от $4,8 \times 10^5$ до 7×10^6 сп./мкл, средняя концентрация по всем пробам – $1,5 \times 10^6$ сп./мкл за все года.

Влияние способа подготовки препарата спермы для микроскопирования на характеристики движения сперматозоидов.

Сравнение данных, полученных при применении стандартной методики (Павлов, 2006), в которой мазок накрывается покровным стеклом и собственной модификации (регистрация сперматозоидов в свободной капле) показали, что способ подготовки препарата спермы для микроскопирования оказывает существенное влияние на такие характеристики активности сперматозоидов, как процент подвижных сперматозоидов, скорость и длительность движения.

Средняя скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции в видео образцах, полученных в 2007 г. по стандартной методике, составляла 38 мкм/с, доля подвижных сперматозоидов в пробе составляла 17 % (Рисунок 1), время подвижности после активации не превышало 15. При применении модифицированной методики в 2008 г средние скорости в среднем были в три раза больше (125 мкм/с), чем при применении стандартной методики, доля подвижных сперматозоидов, достигала 99 % (Рисунок 1).

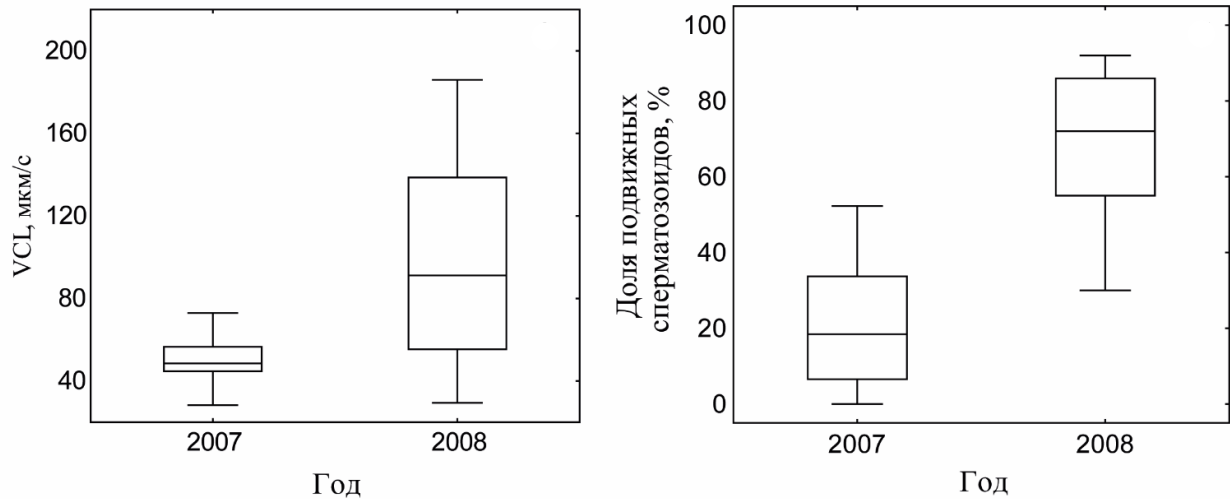


Рисунок 1 – Скорости движения и доля подвижных сперматозоидов при применении стандартной (2007 г.) и модифицированной методики (2008 г.)

Проведенные нами исследования позволили установить, что метод оценки характеристик движения сперматозоидов в свободной капле на предметном стекле (используемый нами в последующих исследованиях) является оптимальным для микроскопирования разбавленной спермы с целью выяснения характеристик ее движения.

Влияние степени разбавления спермы на характеристики активности сперматозоидов.

В результате эксперимента по разбавлению спермы стерильной морской водой в разных соотношениях (1:10 и 1:100), показано, что высокое разбавление снижает характеристики подвижности сперматозоидов. Так средний VCL сразу после активации морской водой при разведении в соотношении 1:10 составил 85 ± 20 мкм/с, средний процент подвижных сперматозоидов во всех образцах составил 80%, для сперматозоидов при разведении в соотношении 1: 100 – 46 ± 16 мкм/с, средняя доля подвижных сперматозоидов во всех образцах составила 28 %. Через 20 минут при разбавлении в соотношении 1:10 средние VCL составили 61 ± 20 мкм/с, доля подвижных сперматозоидов – 66 %, для разбавления 1:100 – VCL = 36 ± 10 мкм/с, 27 % соответственно.

Таким образом показано, что для полной активации спермы калкана, достаточно 10% растворения семенной жидкости в морской воде, так же, как и для атлантического тюрбо (Suquet *et al.*, 1993), самая высокая активность спермы достигается при её разбавлении не более 1:10.

Динамика активности спермы калкана в зависимости от времени после активации.

Сразу после активации спермы морской водой и в течение первых 20 мин сохраняется высокий процент подвижных сперматозоидов практически во всех пробах, через 30 мин

после активации средние показатели активности достоверно снижаются. (Рисунок 2).

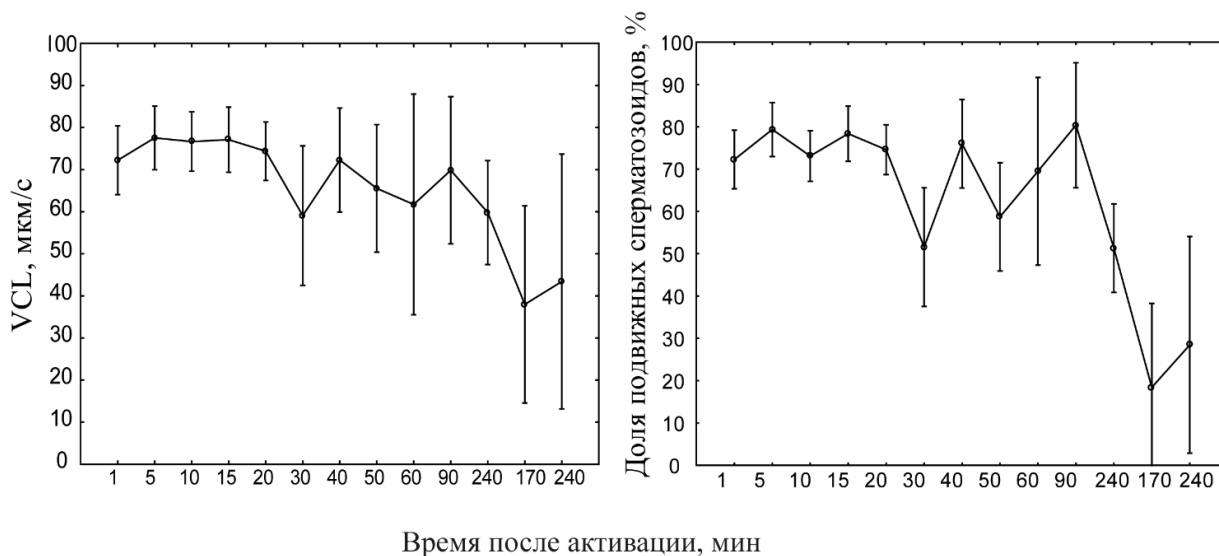


Рисунок 2 – Средние (для 8 самцов) скорости движения сперматозоидов по криволинейной дистанции (VCL) и доли подвижных сперматозоидов в течение 240 мин. после активации.

Обнаружено длительное (на протяжении нескольких часов) сохранение значительной доли подвижных сперматозоидов у части самцов. Так для двух проб спермы, через активность сперматозоидов сохранялась до 7 часов, произошел значительный спад средней характеристик подвижности, однако, доля подвижных сперматозоидов составляла еще значительный ресурс – 15–35 %, с относительно высокими значениями скорости отдельных сперматозоидов до 130 мкм/с, и средней скоростью в пределах 80–85 мкм/с.

Так как существует зависимость между подвижностью сперматозоидов и их оплодотворяющей способностью, можно предположить, что фертильность спермы калкана в отдельных случаях может сохраняться до 7 ч после активации морской водой.

Межгодовые показатели характеристик активности спермы калкана

Анализ результатов исследований спермы калкана в период нереста на примере сравнения 2008, 2010, 2012–2014 гг. показал, что в эякуляте половозрелых самцов характеристики активности сперматозоидов могут варьировать как по индивидуальным, так и по межгодовым показателям.

Процент подвижных сперматозоидов в индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана в 2008 г. варьировал в пределах 30–90 %, а в 2010 г. – в 70–99 %, в 2012, 2013 и 2014 гг. в пределах 38–98 %, 15–95 % и 20–99 %, соответственно. Максимальная скорость отдельных сперматозоидов спермы самцов из нерестового стада за 2008, 2010, 2012–2014 гг. была зарегистрирована в 2010 г. и составила 430 мкм/с (Рисунок 3).

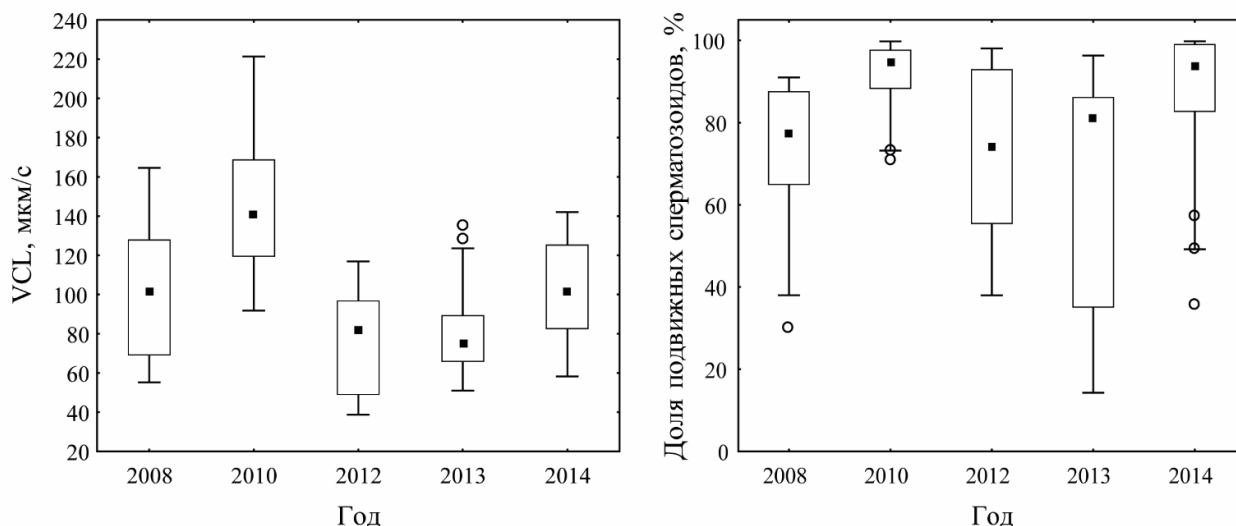


Рисунок 3 – Изменение средней скорости (VCL, мкм/с) и доли подвижных сперматозоидов в 2008, 2010, 2012–2014 гг.

Среднестатистические показатели доли ($N = 17,8$; $p = 0,0014$) и скорости подвижных сперматозоидов ($N = 34,9$; $p = 0,0001$) у самцов калкана из нерестовой популяции 2010 г. оказались значимо выше по сравнению с нерестовыми популяциями других годов.

Совокупность биологических отличий производителей нерестового стада 2010 г. от производителей нерестовых стад предшествующих и последующих лет позволяет предположить, что популяция 2010 г., нерестившаяся в локальных водах Севастополя, возможно, находилась в оптимальной экологической обстановке в преднерестовый период. В благоприятных экологических условиях характеристики спермы калкана скорее всего будут приближаться к таковым у нерестовой популяции 2010 г.

Вариабельность характеристик спермы камбалы калкана в зависимости от фазы нерестового периода

Для установления наличия тенденции изменения характеристик спермы в течение нерестовых сезонов, проводили сравнения усредненных данных характеристик спермы камбалы калкана, полученных в 2007, 2008, 2010 гг. в зависимости от фазы репродуктивного сезона. Для проб, отобранных в 2007 г., доля подвижных сперматозоидов коррелировала с фазой нерестового сезона и коэффициент вариации был равен 0,61 при $p = 0,0001$, в 2008 г. коэффициент был значительно ниже 0,42, при $p = 0,03$. Скорость движения сперматозоидов значимо не изменялась в течение нерестового сезона. В 2010 г. корреляции между характеристиками спермы и фазой нерестового сезона не обнаружено.

Наибольшие коэффициенты вариаций скоростей движения сперматозоидов рассчитаны для проб от самцов, выловленных в начале сезона нереста, что, возможно, свидетельствует о разном физиологическом состоянии и асинхронности сперматогенеза отдельных особей.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса не выявил достоверных отличий скорости ($N = 1,73$, $p = 0,62$) и доли подвижных

сперматозоидов ($N = 4,9$, $p = 0,18$) в течение разных фаз нерестовых сезонов 2007, 2008, 2010 гг.

Наличие связи между размерно-возрастными и биологическими характеристиками самцов и свойствами спермы калкана

Для установления наличия связей между размерно-возрастными и физиологическими характеристиками самцов был проведен корреляционный анализ между такими характеристиками как: скорость движения сперматозоидов по криволинейной дистанции, длина самца, соматический вес, вес печени и гонад. Результаты корреляционного анализа не выявили достоверных между размером, возрастом, упитанностью самцов калкана и характеристиками их спермиации (Таблица 1).

Таблица 1 – Коэффициент корреляции Пирсона между морфологическими характеристиками самцов и характеристиками их спермы

	SL	W общая	W печени	W гонад
Год	0,28 $p=0,057$	0,39 $p=0,007$	0,13 $p=0,393$	-0,14 $p=0,332$
VCL	0,20 $p=0,176$	0,18 $p=0,220$	0,07 $p=0,641$	-0,05 $p=0,753$
Доля подвижных сперматозоидов	0,23 $p=0,121$	0,29 $p=0,042$	0,14 $p=0,357$	-0,14 $p=0,359$

Чтобы определить возможную взаимосвязь переменных и влияние различных факторов на характеристики подвижности сперматозоидов, провели анализ данных методом главных компонент. В анализе учитывали данные по таким характеристикам как: год, фаза нерестового сезона, средняя скорость по криволинейной дистанции, доля подвижных сперматозоидов, общий вес самцов, их общая длина, вес печени и вес их гонад. Выявлено, что три фактора «объясняют» в сумме 70 % общей изменчивости переменных, выбранных для анализа. Первый фактор, обуславливающий размерно-весовые характеристики самцов, объясняет 32 % дисперсии, второй, объединяющий характеристики подвижности спермы и год, – 20 %, третий, вес гонад и фаза сезона, – 18 %.

Таким образом, в течение периода с середины апреля по середину июня 2008, 2012–2014 годов, исследуемые размерные и биологические характеристики самцов не влияли на характеристики подвижности их сперматозоидов.

Основные характеристики подвижности спермы определялись годом, в который проводили лов камбалы. Так у самцов, отловленных в нерестовый сезон 2010 г., было выявлено более высокое качество спермы (а именно, процент подвижных сперматозоидов и VCL), чем в другие годы (2008, 2012–2014).

Развитие и выживаемость эмбрионов и личинок калкана

В течение нерестовых сезонов 2007–2010 гг. диаметр качественной оплодотворенной икры разных самок калкана находился в пределах от 1255 ± 14 мкм до 1352 ± 42 мкм, а диаметр жировой капли от 208 ± 7 до 224 ± 9 мкм, Морфологические параметры икры варьировали в зависимости от родительского фактора ($k = 0,61$, $p = 0,01$)

и от фазы нерестового сезона ($k = 0,53$, $p = 0,03$). Обнаружена значимая корреляция между коэффициентом вариации стандартной длины личинок на выклеве и родительским фактором ($k = 0,70$, $p = 0,04$). Коэффициенты корреляции между другими факторами оказались недостоверными. Подтверждено, что толерантность к повышенным температурам в начале эмбриогенеза ниже, чем на этапах завершения гастрюляции и выклева. Оптимум температур для раннего развития калкана в начале сезона нереста сдвинут к $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, к середине и концу к $15\text{--}18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Оценка качества эмбрионов и ранних личинок камбалы калкана.

Оценка симметрии деления клеток на ранних стадиях (бластомера) является хорошим индикатором состояния (качества) икры камбалы калкана. У калкана наблюдали зависимость между правильностью деления бластомеров и последующей выживаемостью эмбрионов и личинок во время раннего онтогенеза.

Наиболее распространенным дефектом на ранних этапах развития оказалась асимметрия бластомеров. Другие аномалии, такие как полное разделение бластомеров, обнаружены только в отдельных экспериментальных партиях. Процент аномальных бластомеров на стадии дробления влиял на процент выклева личинок.

На стадии гастрюляции аномалии выражались в замедлении процесса эпиболлии и неполном обрастании желтка клеточным материалом. Аномалии на этапе органогенеза часто были связаны с искривлением тела в разных плоскостях, обусловленных искривлением хорды. Личинки могли выклевываться, но большая их часть погибала до стадии перехода на внешнее питание.

Процент аномалий на ранних стадиях развития снижался от начала к середине сезона. Относительный процент аномалий более позднего развития возрастал к концу нерестового сезона.

Влияние родительского «фактора» на качество и выживаемость икры и личинок калкана

По итогам экспериментов развития икры в ходе нерестовых сезонов 2007 и 2009 г. для определения влияния родительского фактора на качество икры были рассчитаны коэффициенты вариабельности морфологических параметров икры и личинок. Для каждой самки калкана средний индивидуальный CV диаметра овулировавших икринок за сезон 2009 г находился в пределах от 1,2 до 5. Вариабельность размеров икры, полученной в различные фазы нерестового сезона была различна: CV диаметра икры от 5 % до 1,9 %, длины личинок от 2,3 % до 7,2 в начале сезона, CVD икры 2,3 и CVSL личинок от 2,6 до 3,8 в середине, и CVD икры 3,2 и CVSL личинок 2,3 до 3,8 в конце сезона. Соответственно менялся и процент выклева для оптимальных температур фазы нерестового сезона в среднем 17, 25 и 37 %.

Для обнаружения зависимости вариабельности размеров выклюнувшихся личинок от вариабельности диаметра овулировавших икринок были рассчитаны коэффициенты корреляции между этими параметрами (Таблица 2).

Таблица 2 – Матрица корреляций между размерными характеристиками икры и характеристиками личинок на выклеве

	Sl личинок на выклеве	CV SL личинок	VYS	CV VYS	OD личинок на выклеве	CV OD личинок
D икры,	0,27 p=0,48	-0,65 p=0,06	-0,18 p=0,64	-0,72 p=0,03	0,42 p=0,26	-0,71 p=0,03
CV D икры	-0,25 p=0,52	0,61 p=0,084	0,24 p=0,53	0,73 p=0,03	-0,33 p=0,38	0,58 p=0,01
OD икры,	0,10 p=0,79	-0,57 p=0,11	0,29 p=0,44	-0,42 p=0,27	0,53 p=0,15	-0,45 p=0,22
CV OD икры	-0,19 p=0,63	0,53 p=0,14	-0,24 p=0,54	0,44 p=0,27	-0,62 p=0,08	0,51 p=0,17

Было показано, что вариабельность диаметра икринок достоверно коррелирует с вариабельностью объема желточного мешка у выклюнувшихся личинок $k = 0,70$ и диаметром жировой капли $k = 0,58$.

Была установлена достоверная отрицательная корреляция между коэффициентом вариации диаметра икринок и процентом выклева ($k = -0,44$, $p = 0,05$). Было показано, что диаметр икры изменялся в зависимости от родительского фактора ($k = 0,61$, $p = 0,01$) и фазы нерестового сезона. Была обнаружена корреляция между коэффициентом вариации стандартной длины личинок на выклеве и родительским фактором ($k = 0,70$, $p = 0,04$). Таким образом вариабельность размерных признаков находилась в зависимости от качества родительских гамет. Коэффициенты вариации между размерными характеристиками личинок и других факторов были недостоверны.

Обнаружены различия между размерами личинок, полученных в нерестовом сезоне 2007 г. при одновременном оплодотворении икры от одной самки спермой разных одновозрастных самцов из одной нерестовой группы. При вылуплении личинки имели одинаковые размеры тела, различия в характеристиках личинок заключались в разных длинах на выклеве и в разной скорости роста за счет запасов желточного мешка на стадии экзогенного питания.

Таким образом, выживаемость личинок, их успешное правильное развитие и рост до этапа перехода на экзогенное питание зависели не только от качества самой икры, т.е. от влияния материнского фактора, но и от свойств зародыша, передаваемых по отцовской линии.

Термочувствительность икры и личинок, полученных от разных производителей в разные фазы нерестового периода

Для икры, полученной от 3-х вариантов оплодотворений, произведенных в начале сезона размножения (20.04.09) (Рисунок 4), процент выживаемости, зарегистрированный на 1-е сутки после оплодотворения, был значительно выше при $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и в среднем составил 90 %, чем при $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, в среднем 60 %. На 2е сутки – при $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (этап III начало эмбриональной стадии) смертность эмбрионов (для всех партий икры) составила 90 %, при $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ эмбрионы находились на стадии ранней гастролы, их смертность в среднем

составила 50 %. Выклев предличинок при 15 °С произошел на 4-е сутки, в среднем выклюнулось 18 %, при 18 °С на 4 сутки вся икра погибла до начала выклева.

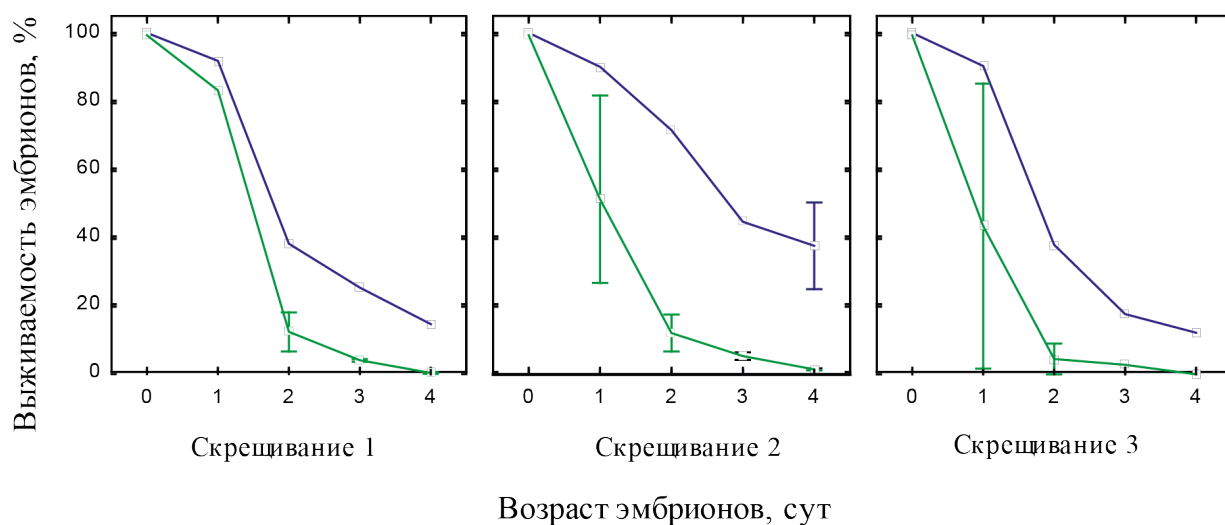


Рисунок 4 – Выживаемость икры калкана в начале сезона нереста в зависимости от температуры (дата оплодотворения 20.04.09, партии 1–3) (синий тренд – 15 °С, зеленый тренд – 18 °С)

В экспериментах с икрой, полученной в середине сезона нереста калкана (Рисунок 5), на первые сутки процент выживаемости икры, инкубируемой при 21, 18 и 15 °С был приблизительно одинаковым и равным 70 %. На 3-е сутки процент выживаемости при 18 °С был несколько выше в 4 и 3 партиях – 54 и 37 % соответственно, чем при 15 °С – 51 и 25 %; и существенно ниже при 21 °С – 30 и 10 %. Лучшую долю выклева наблюдали при 18 °С, она составила 39 % для 4-ой партии и 16 % для 5-ой, несколько ниже выклев был при 15 °С – 36 и 11 %, а для 21 °С – 15 и 6 % соответственно.

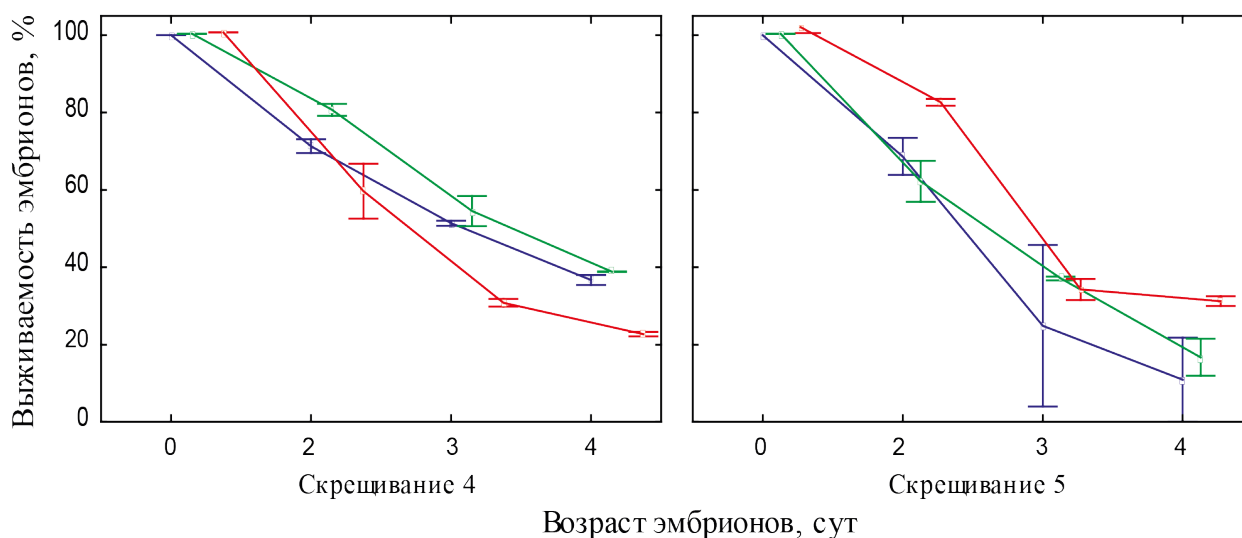


Рисунок 5 – Выживаемость эмбрионов калкана от момента оплодотворения до выклева в зависимости от температуры (синий тренд – 15 °С, зеленый – 18 °С, красный – 21 °С) и отцовской наследственности (партия от 14.05.09)

Выживаемость личинок от 4-го скрещивания при 15, 18 и 21 °С (Рисунок 6) была практически одинаковой от момента выклева до перехода на внешнее питание для всех температур. Для икры 5-го скрещивания температура оказывала значительное влияние на выживаемость личинок. Наилучший процент выживаемости наблюдался при 15 °С, худший – при 21 °С. Доля выживших личинок, инкубируемых при 18 °С за время от момента выклева до перехода на внешнее питание, совпадала со значениями, полученными для 4-го оплодотворения.

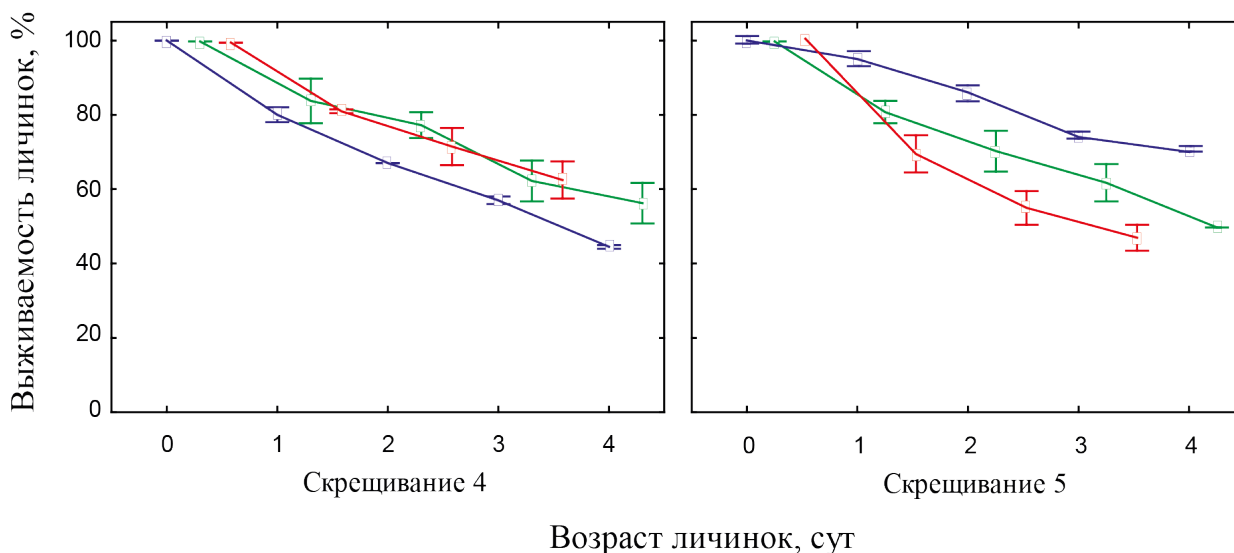


Рисунок 6 – Выживаемость личинок калкана от момента выклева до перехода на экзогенное питание, в зависимости от температуры (синий тренд – 15 °С, зеленый – 18 °С, красный – 21 °С) и отцовской наследственности (партия от 14.05.09)

При оценке размерных характеристик личинок было выявлено, что при 15 °С только что выклюнувшиеся личинки имели существенно меньшую длину тела $Sl = 2400 \pm 70$ мкм, большую жировую каплю $D = 230 \pm 14$ мкм и желточный мешок $VYS = 1,02 \pm 0,4 \times 10^9$ мкм³, чем при 18 °С – $Sl = 3180 \pm 80$ мкм, $D = 220 \pm 10$, $VYS = 0,57 \pm 0,0003 \times 10^9$ мкм³ и 21 °С – $Sl = 3200 \pm 120$ мкм, $D = 218 \pm 12$ мкм, $YS = 0,37 \pm 0,0008 \times 10^9$ мкм³.

Личинки, инкубируемые при 15 °С, отставали в развитии и росте (значимо при $p \leq 0,05$) от момента выклева до 3-х суток, по сравнению с личинками, содержащимися при 18 и 21 °С. К концу 3-х суток размеры личинок, инкубируемых при 18 и 21 °С, сравнялись и составили в среднем $Sl = 3430 \pm 40$ мкм. В то время как личинки при 15 °С обогнали их в росте $Sl = 3460 \pm 50$ мкм и к моменту открытия рта имели длину тела равную $Sl = 3530 \pm 35$ мкм. Резорбция желточного мешка у личинок, содержащихся при 18 и 21 °С, произошла на 2-е сутки, а при 15 °С на третьи.

Личинки, выращенные при 21 °С, были готовы к экзогенному питанию на 3-е сутки после выклева, однако после открытия рта эти личинки не смогли перейти на внешнее питание. В то время как, личинки, инкубируемые при 15 и 18 °С, успешно питались уже на 5-е сутки после выклева. Таким образом, личинки, инкубируемые при 15 °С, расходовали энергетические запасы (желток и жировая капля) медленнее и

эффективнее, и к моменту полной резорбции желточного мешка имели более крупные размеры тела.

Для анализа влияния температуры на выживаемость икры и личинок в конце сезона, в эксперименте использовали икру, полученную от одного скрещивания. Максимально высокий отход икры (Рисунок 7) при всех температурах был зарегистрирован на вторые сутки после оплодотворения (то есть после стадии бластуляции, перед или в начале гастрюляции). Отход икры, содержащейся при 15 °С, составил 46 %, при 18 °С – 50 % и при 21 °С – 14 %. Минимальный выклев в этом эксперименте наблюдали при 21 °С, выклюнулось лишь 6 % от первоначального количества икры.

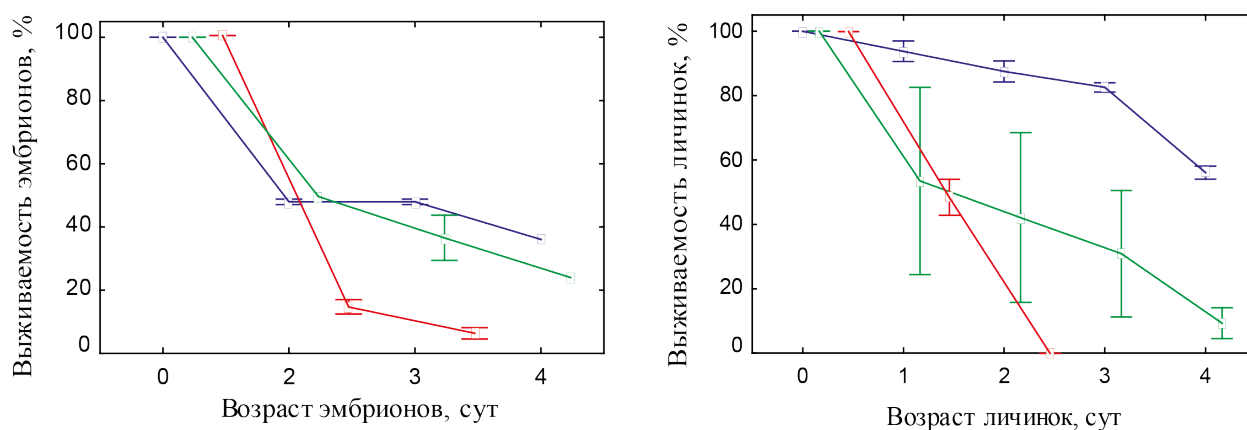


Рисунок 7 – Выживаемость личинок калкана от момента выклева до перехода на внешнее питание в зависимости от температуры (синий тренд – 15 °С, зеленый – 18 °С, красный – 21 °С) (партия от 31.05.09)

На момент выклева личинки при 21 °С были слабыми, стандартная длина тела SL = 2730 ± 50 мкм, OD = 203 ± 15 мкм, VYS = 0,50 ± 0,0006 × 10³ мкм³ и их смертность на вторые сутки после выклева составила 100%. Самый большой процент выклева наблюдали при 15°С (Рисунок 7), он составлял около 36 %, и выживаемость личинок (SL = 2670 ± 76 мкм, OD = 214 ± 13 мкм, VYS = 0,52 ± 0003 × 10⁹ мкм³) от выклева до начала экзогенного питания в этом эксперименте так же была наилучшей (56 %) (Рисунок 7). В то время как при инкубации икры в воде с температурой 18 °С выклюнулось 24 %, на третьи сутки (SL = 2850 ± 108 мкм, OD = 200 ± мкм, VYS = 0,56 ± 0,0007 × 10⁹ мкм³).

К моменту перехода на экзогенное питание на 4-е сутки личинки, содержащиеся при 15 °С, имели размеры SL = 2980 ± 22 мкм, OD = 180 мкм ± 12 мкм. При 18°С выклев произошел на 3–4 сутки, были зарегистрированы наибольшие размеры тела личинок – SL = 3170 ± 50 мкм, OD = 160 ± мкм, по сравнению с личинками, выращенными при других температурах.

Таким образом, оптимальными для всего периода эмбриогенеза являются температуры 15–18 °С. При температуре инкубации 15–18 °С у икры с высоким уровнем оплодотворения (до 95 %) и синхронным развитием всех эмбрионов на этапе дробления, наблюдали минимальное количество аномалий на последующих этапах и максимальный выклев личинок без видимых морфологических отклонений.

В среднем, для разных партий, длительность эмбрионального развития калкана от оплодотворения до выклева при постоянной температуре составляет около 4,5 суток – при 15 °С, 3 суток – при 18 °С и 2,5 суток при 21 °С. Для получения наибольшего процента жизнеспособных личинок наиболее целесообразно инкубировать икру в режиме повышающихся температур – от 15 °С на самых ранних этапах в начале нереста до 17–18 °С в конце.

Влияние гидрологического режима на выживаемость икры и выживаемость, и рост личинок калкана.

Проведенные в 2010 г. эксперименты по влиянию гидрологического режима показали, что при инкубации икры без продувки (Рисунок 8), процент выклева составил 26%, личинки на выклеве имели более крупные размеры тела ($SL = 3130 \pm 80$ мкм) и больший по объему желточный мешок ($VYS = 0,37 \times 10^9$ мкм³) по сравнению с личинками при слабой (выклев 18 %, $SL = 3100 \pm 50$ мкм $VYS = 0,32 \times 10^9$ мкм³) и сильной продувке (выклев 12 %, $SL = 3100 \pm 70$ мкм, $VYS = 0,29 \times 10^9$ мкм³).

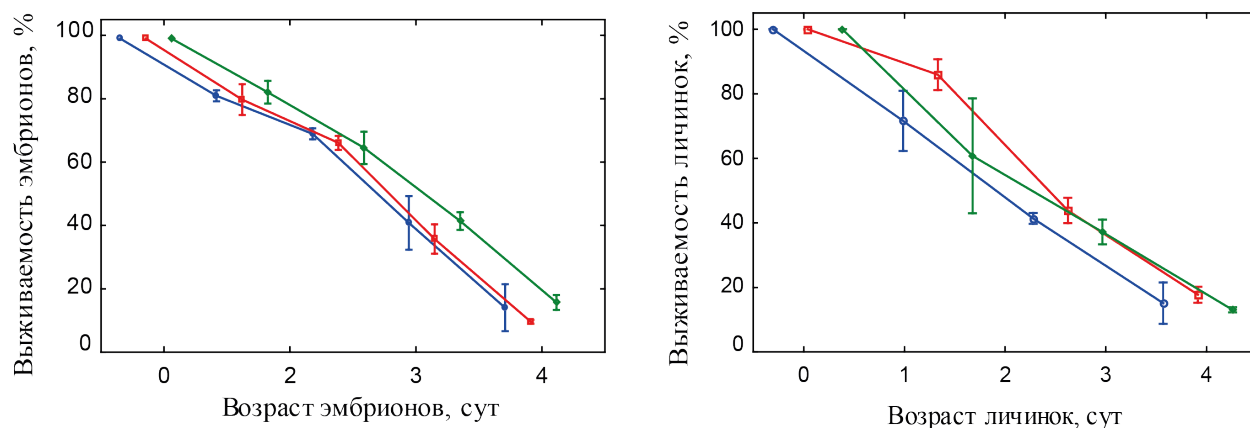


Рисунок 8 – Выживаемость эмбрионов от момента оплодотворения до выклева и личинок момента выклева до перехода на экзогенное питание при различных условиях продувки воздухом (зеленый тренд – без продувки, синий – при слабой продувке, красный – при сильной продувке)

У выклюнувшихся предличинок после инкубации икры без барботажа наблюдали наибольший коэффициент вариации по стандартной длине тела $CV\ SL = 6,5$ % и наименьший разброс по коэффициентам вариации диаметра жировой капли $CVOD = 2,8$ % и объему желточного мешка $CVVYS = 0,29$ % (Рисунок 8). Расход желточного мешка и жировой капли у них происходил медленнее и эффективнее, чем у личинок, инкубируемых в условиях слабой и сильной продувки, и как следствие, к выклеву были способны предличинки с различными размерами тела (SL).

Выживаемость личинок в возрасте 1 сут (к концу первых суток после выклева), находящихся в режиме сильной продувки, была выше – 86 % по сравнению с выживаемостью личинок, инкубируемых без продувки – 56 % и при слабой продувке – 72 % ($F = 26$, $p = 0,01$) (Рисунок 8). Это можно объяснить тем, что при сильной продувке в течение эмбриогенеза происходила элиминация менее жизнеспособных (с вероятными скрытыми дефектами) и отбор более жизнеспособных личинок (выключилось лишь 14 % личинок от общего количества инкубируемых икринок).

Проведенные эксперименты по влиянию гидрологического режима позволяют утверждать, что барботаж на уровне (30–75 мл/мин) негативно влияет на процент выклюнувшихся личинок, однако снижение выживших к моменту выклева личинок, по видимому, связано с элиминацией личинок с отклонениями развития, и таким образом продувка (30–75 мл/мин), имитирующая невысокую турбулентность, на определённых этапах может оказаться эффективным способом отбора наиболее жизнеспособных жизнестойких ранних личинок (предличинок) для повышения доли выживших личинок к началу активного внешнего питания.

Заключение

Эффективность реализации нерестового потенциала черноморской камбалы калкана *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814), одного из самых ценных промысловых видов рыб Чёрного моря и перспективного объекта марикультуры, определяется комплексом абиотических и биотических факторов. Успешность воспроизводства рыб определяется качеством половых продуктов производителей. Качество гамет варьирует под влиянием различных факторов.

В нашей работе проанализированы межгодовые вариации подвижности спермы самцов калкана на примере нерестовых популяций калкана Севастопольского региона. Показано, что активную сперму продуцируют до 90 % половозрелых самцов нерестового стада. Доля подвижных сперматозоидов в активированных черноморской водой индивидуальных пробах эякулята самцов нерестовой популяции калкана находилась в пределах от 30 до 99 %, соответственно. Средняя скорость движения сперматозоидов (100 ± 52 мкм/с) оказалась сопоставима с приведёнными в литературе данными для камбалообразных рыб. Максимальная скорость отдельных сперматозоидов (430 мкм/с) и более высокие средние скорости были зарегистрированы для самцов, выловленных в 2010 г. Предполагается, что производители нерестового стада 2010 г. находились в более благоприятных экологических условиях, что положительно повлияло на характеристики подвижности их спермы и соответственно ее качество.

Характеристики подвижности спермы для разных особей калкана из естественных популяций значительно варьируют, в целом длительность подвижности сперматозоидов существенно превышает подобные показатели не только для камбалообразных (до 7 часов), но и для большинства видов морских рыб, с которыми проводились аналогичные исследования. Нами показано, что на оценку характеристик активности спермы значимо влияют вариации применяемых методик и среды активации сперматозоидов, способ микроскопирования и степень разбавления спермы активирующей средой, а именно увеличение разбавления уменьшает скорости движения сперматозоидов, что может влиять на успешность оплодотворения. В свою очередь методика микроскопирования может ухудшать параметры подвижности сперматозоидов, такие как скорость, процент подвижных сперматозоидов и общий период их подвижности.

Количественные характеристики подвижности спермы черноморского калкана свидетельствуют о высоком репродуктивном потенциале самцов данного вида в естественной популяции Севастопольского района и сопоставимым с таковыми для близкородственного вида – тюрбо *Scophthalmus maximus*.

Результаты экспериментов по оценке жизнеспособности эмбрионов при

скрещивании производителей в течение нерестового сезона показали, что на ранних стадиях развития в начале нереста наблюдается высокий процент смертности. Высокая смертность икринок калкана на этапах эмбрионального развития связана с большим количеством нарушений эмбриогенеза, обусловленных, по-видимому, как нарушениями развития ооцитов, так и собственным геномом эмбрионов, оптимального сочетания температурных и кислородных, и отсутствия повышенной турбулентности.

Большая часть аномалий у зародышей возникала на ранних стадиях развития, предшествующих гаструляции. Эти аномалии, по-видимому, были связаны с состоянием исходной неоплодотворенной икры калкана, так как большая часть аномалий заключалась в неправильном делении бластомеров и нарушениях мембранных структур зародыша и желтка. Считается, что большая часть аномалий, возникающих на стадиях до гаструляции, происходит в результате нарушений состава запасных питательных веществ эмбриона, и (или) нарушений женского генома. Более поздние стадии развития эмбриона находятся уже под управлением характеристик генома зародыша. Процент аномалий на ранних стадиях развития снижался от начала к середине сезона. Относительный процент аномалий более позднего развития, по предварительным данным, возрастает к концу нерестового сезона.

Разнокачественность личинок калкана выражается как в размерных характеристиках вылупившихся личинок, так и в разной обеспеченности их желтком. Соответственно, вариации размеров выклюнувшихся личинок определяется качеством половых продуктов, полученных от производителей. Выживаемость икры и личинок зависит не только от качества самой икры, т.е. от влияния материнского фактора, но и от качеств, наследуемых по отцовской линии.

Характеристики развития зародыша могут быть связаны с генетическими особенностями производителей и определять выживаемость как на ранних этапах онтогенеза, так и на более поздних стадиях развития на выклеве. Длина личинок калкана на выклеве и размеры их желточного мешка и жировой капли определяются комплексом материнского «фактора» и абиотических условий. Материнский «фактор» обусловлен как генетической наследственностью (включающей хромосомную и цитоплазматическую компоненту), так и индивидуальным состоянием (биохимическим составом) запасных веществ, содержащихся в желтке и жировой капле ооцита. Размер и качество (размеры и биохимический состав запасных веществ в желтке и жировой капле) икры самок могут значительно влиять на скорость роста и выживаемость в период раннего развития личинок.

Обнаруженные нами различия в скорости развития эмбрионов и достоверные различия длины личинок полу-сиссов калкана по отцовской линии, разница в скорости роста личинок на стадии экзогенного питания (до раскрытия рта), использования желтка и жировой капли от выклева до момента раскрытия рта (при исходных одинаковых характеристиках икры, полученной от одной самки), связаны с наследственностью, переданной от самцов. Отцовский фактор может в значительной мере определять выживаемость и характеристики личинок калкана к моменту перехода на внешнее питания. Синергетический эффект влияния плохого качества гамет обоих полов может приводить не только к низкому проценту нормального оплодотворения и/или к низкому

качеству потомства, которые приводят к значительному снижению эффективности воспроизводства популяции.

Собственные данные экспериментальных исследований развития эмбрионов и личинок, полученных при искусственном оплодотворении черноморского калкана, показали, что длина личинок на выклеве и при переходе на внешнее питание (3–4 сут после выклева) зависит от комбинации биотических и абиотических факторов, а именно: «материнский» фактор (качество желтковых запасов икры и генетическая составляющая), «отцовский» фактор (генетическая составляющая) и (в отсутствии мутагенных факторов) значительную роль оказывает температурный фактор, влияние которого складывается из температуры, при которой развивался ооцит, температуры при которой происходило оплодотворение и развитие до момента выклева. Соответственно, стандартная длина личинки калкана на выклеве под влиянием совокупности указанных факторов может варьировать от 2870 до 3200 мкм. Температура оказывает влияние на скорость утилизации желтка и его использование на рост предличинки калкана до ее перехода на экзогенное питание.

Термочувствительность эмбрионов, находящихся на разных этапах развития, и полученных от производителей в разные фазы нерестового сезона различна. Толерантность к повышенным температурам в начале эмбриогенеза ниже, чем на этапах завершения гастрюляции и выклева. Температурный оптимум выживаемости икры и личинок, полученных в начале естественного нерестового сезона калкана, сдвинут к температуре 15 °С. Температурный оптимум развития эмбрионов и личинок калкана в середине и конце нерестового сезона находится в диапазоне 15–18 °С. Проведенные нами исследования по выживаемости икры калкана позволяют предположить различный диапазон термопреферендума икры и личинок, полученных от производителей в разные фазы нерестового периода.

Проведенные эксперименты по влиянию гидрологического режима позволяют утверждать, что сильный барботаж негативно влияет на выживаемость личинок калкана на выклеве, однако элиминация личинок с отклонениями развития может оказаться эффективным способом отбора наиболее жизнеспособных ранних личинок для повышения выживаемости при дальнейшем развитии.

Таким образом эффективность реализации репродуктивного потенциала черноморского калкана находится под влиянием комплекса биотических (качества исходных гамет, зависящих от состояния производителей к нерестовому сезону) факторов, которые реализуются в зависимости от комплекса абиотических факторов (температурных и гидрологических условий).

Выводы

1. Для спермы черноморской камбалы калкана из нерестовых популяций установлены следующие характеристики активности: средняя скорость движения сперматозоидов составляет 100 ± 52 мкм/с (при максимальной – 427 мкм/с) и доля подвижных сперматозоидов находилась в пределах от 30 до 99 %, соответственно. Концентрация сперматозоидов в сперме находилась в пределах от $4,8 \times 10^5$ до 7×10^6 сп./мкл, средняя концентрация – $1,5 \times 10^6$ сп./мкл за все года.

2. На показатели активности сперматозоидов существенное влияние оказывают способы активации спермы, степень ее разбавления и методы подготовки препарата для микроскопирования. Для полной активации спермы калкана достаточно 10 % разбавления семенной жидкости морской водой, самая высокая активность спермы достигается при её разбавлении в соотношении не более 1:10.

3. Высокие показатели активности спермы черноморского калкана сохраняются в течение первых 20 мин после ее активации морской водой. Длительность активности спермы отдельных самцов после ее активации может достигать 7 часов, максимальные для всех камбалообразных.

4. Одним из важных критериев качества икры калкана является низкий коэффициент вариабельности размеров икринок и симметрия большинства развивающихся эмбриональных структур.

5. Диаметр качественной оплодотворенной икры для разных самок калкана составлял от 1250 до 1370 мкм, а диаметр жировой капли – от 200 до 235 мкм.

6. Оптимум температур для развития и выживаемости эмбрионов и личинок калкана в начале репродуктивного сезона сдвинут к температурам (15 °С), в середине и конце сезона находится в пределах 15–18 °С. На выклеве при 15 °С только что выклюнувшиеся личинки имеют существенно меньшую длину тела, по сравнению с личинками, содержащимися при 18 и 21 °С, но к моменту перехода на внешнее питание обгоняют их в росте. Эффективность использования желтка на рост достоверно выше при 15 °С.

7. Впервые для калкана изучено влияние отцовского фактора на выживаемость и характеристики личинок на выклеве и переходе на внешнее питание. Вариабельность размеров личинок на этапе перехода на внешнее питание определяется как материнским, так и отцовским факторами.

8. Выявлено, что на этапах эмбрионального развития наличие слабого барботажа является фактором, негативно влияющим на выживаемость эмбрионов, но выживаемость личинок от выклева до перехода на внешнее питание повышается и происходит отбор более жизнеспособных личинок.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. **Baiandina I. S.**, Khanaychenko A. N. Water turbulence effect on egg survival and characteristics of hatched larvae of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) // Marine Biological Journal. – 2018. – Т. 3. – №. 4. – С. 101-105. (SCOPUS)
2. **Baiandina I. S.**, Khanaychenko A. N. Optimization of the Method for Determining the Motility Characteristics of Fish spermatozoa Using ImageJ Software and Excel Macros // Journal of Ichthyology. – 2019. – Т. 59. – №. 1. – С. 127-130 (SCOPUS/WoS)
3. **Baiandina Iu.**, Giragosov V., Khanaychenko A. Male reproductive potential in the Black Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) spawning populations // Fisheries Research. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106367> (Online first) (SCOPUS/WoS)

Статьи в других изданиях

4. **Баяндина Ю. С.** Характеристики подвижности спермы черноморской камбалы калкана из естественных популяций // Морской экологический журнал - 2013. - Т. 12 (2). - С. 11 – 18
5. **Baiandina Iu.** Black Sea turbot sperm motility depending on the dilution of seawater // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021. Vol. 937. Article 022076 (SCOPUS)

Материалы и тезисы конференций

6. Гирагосов В. Е., Ханайченко А. Н., Рауэн Т. В., Аганесова Л. О., Баяндина Ю. С., Смирнов Д. Ю. Оценка состояния природной популяции и культивирование черноморской камбалы-калкана в ИнБЮМ (ИМБИ): достижения, ограничения и перспективы // Материалы международной научной конференции «Актуальные проблемы аквакультуры в современный период» (Ростов-на-Дону, 28.09 – 02.10.2015). – Ростов-на-Дону, 2015. – с. 43-4647-52.
7. Баяндина Ю. С. Характеристики подвижности спермы калкана *Scophthalmus maeoticus* (Pallas) из естественных популяций Севастопольского района в течение нерестовых сезонов 2010– 2017 гг. // Тез. X Международной научно-практич. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2017» по проблемам водных экосистем, в рамках проведения Года экологии в Российской Федерации (17 – 20 ноября 2017 г.). – Севастополь, 2017.-С. 31-32.
8. Гирагосов В. Е., Ханайченко А. Н., Аганесова Л. О., Рауэн Т. В., Смирнов Д. Ю., Баяндина Ю. С., Моисеенко Д. В. Некоторые особенности биотехнологии культивирования черноморского калкана и перспективы её применения в практическом рыбоводстве // Водные биоресурсы и аквакультура юга России: Материалы Всерос. науч.-практ. конф., приуроченной к 20-летию открытия в Кубанском гос. ун-те направления подготовки «Водные биоресурсы и аквакультура» (г. Краснодар, 17-19 мая 2018 г.). Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2018. С. 318–323.
9. Баяндина Ю. С. Термочувствительность икры и личинок камбалы калкана, полученных от разных производителей, в разные фазы нерестового сезона // Современная гидробиология: глобальные проблемы Мирового океана : материалы XI Всерос. онлайн-школы-семинара для молодых ученых, студентов и аспирантов, г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2020 г. Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2020. С. 9-10. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/8669>
10. Baiandina Iu. S. Black Sea Turbot Sperm Motility Depending on the Dilution of Seawater // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: тез. докл. Междунар. науч. конф., посвящ. 150-летию Севастопольской биологической станции — Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий», 13–18 сентября 2021 г., Севастополь, Российская Федерация. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ, 2021. С. 625.