

Болотовский
Алексей Александрович

**РОЛЬ ТРИЙОДТИРОНИНА В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ И
ФОРМИРОВАНИИ ФЕНОТИПА ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* (L) И
ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* (L)**

Специальность: 03.02.04 – Зоология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Борок, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Научный руководитель:

Лёвин Борис Александрович,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии рыб Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Официальные оппоненты:

Павлов Дмитрий Александрович
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры ихтиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Лайус Дмитрий Людвигович
кандидат биологических наук, доцент кафедры ихтиологии и гидробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Российской академии наук, г. Архангельск

Защита состоится « ... » 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д002.036.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук по адресу: 152742, Ярославская область, Некоузский район, п. Борок, д. 109.

Тел./факс: 8 (48547) 24042; e-mail: dissovet@ibiw.yaroslavl.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук по адресу: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, д. 109. и на сайте <http://www.ibiw.ru>, с авторефератом – в сети Интернет на сайтах ВАК РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и ИБВВ РАН (<http://www.ibiw.ru/>).

Автореферат разослан « ... » 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Л.Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Значение изменчивости в раннем онтогенезе как одного из факторов формообразования широко обсуждается в биологической литературе. Считается, что изменения временных параметров развития органов (темпов, времени закладки и окончания развития) могут оказывать значительное влияние на формирование их дефинитивного состояния и, очевидно, имеют основное значение в эволюции позвоночных (Рэфф, Кофмен, 1986; Hall, 2001; Корочкин, 2002; Гилберт, 2010). Значительная часть внутривидовой морфологической изменчивости у рыб вызывается факторами среды, влияющими на развитие. Как показал ряд исследований, одними из наиболее существенных факторов являются температура, солёность, условия освещенности и кислородный режим (см. обзоры у Lindsey, 1988 и Павлова, 2007). В ответ на изменяющиеся условия окружающей среды, изменяется активность различных морфогенов, транскрипционных факторов и регуляторов экспрессии генов, влияющих на временные параметры развития (Шварц, 1980; Gilbert, 2011). Одним из таких веществ, регулирующих временные параметры развития у позвоночных животных, являются гормоны щитовидной железы (тиреоидные гормоны – ТГ). ТГ участвуют и в регуляции онтогенеза костистых рыб, изменяют темп и сроки морфогенетических процессов. Как правило, высокие концентрации ТГ ускоряют развитие, в то время как при дефиците ТГ (которое достигается действием гойтрогенов, например, тиомочевинной) отмечается замедление развития, то есть различия в концентрации ТГ приводят к гетерохрониям (Brown, 1997; De Jesus et al., 1998; Blanton, Specker, 2007).

В ходе недавних работ показано, что гормональная регуляция временных параметров онтогенеза у рыб приводит к существенным изменениям в дефинитивном фенотипе, в том числе и среди меристических признаков (Смирнов и др., 2006; Смирнов, Лёвин, 2007; Шкиль, Смирнов, 2009; Шкиль и др., 2010; Levin, 2010; Shkil et al., 2012; Smirnov et al., 2012; Levin, Levina, 2014; Shkil, Smirnov, 2015 и др.). Кроме того, показано, что при использовании подхода ТГ-регуляции онтогенеза можно получить новые данные как о механизмах развития признаков, так и данные, свидетельствующие об участии онтогенетических механизмов в изменении дефинитивного фенотипа у рыб в ходе эволюции (Лёвин, 2011; Smirnov et al., 2012).

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о существенном воздействии ТГ на темп онтогенеза рыб, а работы последних лет показывают, что фенотипические последствия гормональной регуляции темпа онтогенеза в значительной степени недооценены. Особенно в сравнении с тем, что известно об эффектах тиреоидных гормонов на эмбрионы и личинки амфибий, млекопитающих и птиц.

Объектами для исследования выбраны карповые рыбы подсем. Leuciscinae – плотва *Rutilus rutilus* (L.) и лещ *Abramis brama* (L.). Данные виды широко распространены в Палеарктике. По их морфологии и развитию накоплены обширные сведения в литературе, что позволяет лучше интерпретировать экспериментальные данные в контексте природной изменчивости видов. При этом плотва известна как более пластичный, изменчивый вид, в то время как морфология леща считается довольно консервативной.

Цель настоящей работы состояла в экспериментальном исследовании роли тиреоидных гормонов в индивидуальном развитии и формировании фенотипа у плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama*.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ уровней трийодтиронина и их сезонную изменчивость в природных популяциях плотвы и леща.
2. Выяснить, как изменяются концентрации трийодтиронина в процессе развития под влиянием экзогенного гормона и тиомочевина.
3. Оценить воздействие тиреоидных гормонов на рост плотвы и леща.
4. Определить степень влияния тиреоидных гормонов на темп развития и на дефинитивное состояние озубления глоточных костей.
5. Определить степень влияния тиреоидных гормонов на признаки осевого скелета.
6. Определить степень влияния тиреоидных гормонов на число лучей парных и непарных плавников.

Научная новизна.

Выявлена значительная изменчивость уровня трийодтиронина в плазме крови плотвы и леща из природных популяций, при этом для плотвы сведения приводятся впервые. В течение двухлетнего цикла наблюдений описана сезонная динамика по содержанию трийодтиронина (T_3) в плазме крови плотвы и леща. Впервые у карповых рыб отмечен преднерестовый пик концентрации T_3 , сопровождающийся падением уровня T_3 во время нереста. Впервые получены данные о влиянии тиреоидных гормонов на рост и темп развития плотвы и леща. Установлено существенное значение тиреоидных гормонов в формировании фенотипа плотвы и леща. Впервые показано, что гетерохронные события в морфогенезе некоторых признаков, вызванные регуляцией тиреоидного статуса, приводят к значительным изменениям в дефинитивной морфологии у карповых рыб подсем. *Leuciscinae*. Впервые подробно изучено и классифицировано нормальное развитие озубления глоточных костей плотвы и леща. Обнаружены различия в паттернах и темпах развития глоточного озубления у рыб с разным тиреоидным статусом. Впервые выявлено статистически значимое влияние экзогенного T_3 на число позвонков у рыб. Обнаружено существенное влияние экзогенного T_3 на число лучей парных плавников и кости тазового пояса у рыб подсем. *Leuciscinae*.

Практическая и теоретическая значимость. Результаты работы имеют значение для понимания механизмов изменения числа сериальных элементов меристических признаков у рыб и эволюции данных признаков. Результаты изучения сезонной изменчивости концентраций T_3 , особенно в преднерестово-нерестовый период, вносят вклад в развитие эндокринологии рыб и могут быть использованы в аквакультуре и воспроизводстве промысловых видов рыб. Полученные данные могут быть использованы при подготовке лекционных курсов и пособий по эволюционной биологии развития, эндокринологии, зоологии позвоночных, экологии и ихтиологии.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Уровень трийодтиронина у плотвы и леща значительно варьирует в течение года. Концентрация трийодтиронина в плазме крови положительно коррелирует с температурой и освещенностью, но годовые колебания включают в себя несколько пиков, в том числе преднерестовый пик.
2. Различие в уровне трийодтиронина в течение раннего развития обуславливает значительную морфологическую дивергенцию по ключевым меристическим признакам у рыб подсем. *Leciscinae* (глоточные зубы, число позвонков, число лучей в парных плавниках).

Соответствие паспорта специальности. Результаты диссертационной работы соответствуют специальности 03.02.04 – зоология, конкретно областям исследования: 3. «Экология животных», 4. «Анатомия и морфология животных» и 14. «Ихтиология».

Личный вклад автора. Автор непосредственно участвовал в сборе полевых материалов, проведении экспериментальных работ, определении концентраций гормона, изготовлении тотальных препаратов и их микроскопии и статистической обработке. Также автор проанализировал, обобщил и представил полученные результаты, сформулировал выводы. Текст диссертации написан по плану, согласованному с научным руководителем. Доля личного участия автора в совместных публикациях пропорциональна числу соавторов.

Апробация работы. Материалы исследований были представлены на Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Экология, эволюция и систематика животных» (Рязань, 2009 и Рязань, 2012), на конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2010), на VIII Международной конференции по раннему онтогенезу рыб и промысловых беспозвоночных (Светлогорск, 2010), на XIV школе-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод» (Борок, 2010), на школе-конференции молодых учёных «Современные представления и методы исследования микроэволюционных процессов» (Борок, 2011), на Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2012), на IV Международном совещании «Междисциплинарные подходы к изучению скелета рыб» (Тавира, Португалия, 2015), 15-м Европейском Ихтиологическом Конгрессе (ЕСI XV) (Порто, Португалия, 2015), 10-й Международной конференции по биоинформатике, регуляции структуры генома и системной биологии (BGRS\SB) (Новосибирск, 2016).

Публикации. По теме работы опубликовано 13 статей, из них 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК (5 статей индексируются в базе Web of Science).

Структура и объём работы. Диссертация общим объёмом 142 страницы состоит из введения, пяти глав, выводов, списка цитированной литературы, включающего 326 работ, из которых 238 на иностранных языках. Иллюстративный материал включает 21 рисунок и 24 таблицы.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю Б.А. Лёвину за всестороннюю помощь при выполнении данной работы, М.А. Лёвиной, А.В. Кожаре, В.Н. Яковлеву, Е.С. Смирновой, В.В. Крылову, Д.П. Карбанову, В.А. Непомнящих, Е.И. Извекову, С.В. Смирнову, Ф.Н. Шкилю, Д.В. Капитановой, С.И. Сиделёву, О.А. Жаровой и Ю.В. Герасимову за помощь в проведении экспериментов, а также за консультации, ценные советы, замечания и рекомендации. Автор благодарен Ю.Г. Изюмову за замечания при подготовке рукописи.

Также автор очень признателен коллективу рыбаков и техническому персоналу лаборатории экологии рыб ИБВВ РАН за помощь в проведении полевых исследований, а также персоналу экспериментальной прудовой базы «Сунога» за помощь на определенных этапах проведения экспериментов. Автор также признателен коллективу ЦКП «Электронная микроскопия» ИБВВ РАН за помощь при изготовлении и микроскопировании препаратов глоточных зубов.

Настоящее исследование поддержано грантами РФФИ (11-04-01252-а, 15-04-03586 и 15-34-20416) и грантами Президента РФ для поддержки молодых российских ученых (МК-476.2012.4 и МК-520.2010.4).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Фенотипическая пластичность и её роль в видообразовании.

Изменчивость меристических признаков у рыб. Тиреоидные гормоны как факторы морфологической изменчивости у рыб

Рассматривается понятие фенотипической пластичности в контексте возможностей генотипа к реализации разнообразных состояний фенотипа. Приводятся данные по закономерностям изменчивости меристических признаков у рыб в естественной среде обитания. Освещены результаты экспериментальных работ по изучению роли различных факторов среды (температура, солёность, освещённость и содержание кислорода в воде), а также темпа развития в формировании изменчивости меристических признаков у рыб. Приводятся данные о роли ТГ в метаболизме, ростовых процессах, развитии и метаморфозе рыб. Рассмотрены эффекты ТГ на темп развития морфологических признаков у рыб. Описывается механизм действия тиреоидных гормонов у рыб.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1. Инкубация икры и выращивание молоди

Производителей ловили непосредственно перед нерестом в Рыбинском водохранилище близ пос. Борок Ярославской области. Оплодотворение икры плотвы и леща осуществляли «сухим способом». После вылупления личинок перемещали в аквариумы (30 л), по мере роста потомства, его перемещали в более крупные ёмкости. В аквариумах ежедневно меняли от 30 до 50% объёма воды с добавлением воздействующих веществ. Рыб кормили природным зоопланктоном, науплиями артемии и сухим кормом для аквариумных рыб. Зоопланктон и артемию давали в избытке.

2.2. Условия эксперимента

Во всех экспериментах сразу после оплодотворения икру разделяли на несколько групп и инкубировали в разных средах. Личинок и молодь также содержали в разных экспериментальных средах – с добавлением экзогенного 3,3',5-трийодтиронина и тиомочевина (гойтрогена, ингибирующего активность щитовидной железы) (см. схему экспериментов в табл. 1). Воздействие веществ продолжали до достижения дефинитивной морфологии изучаемых признаков. Изучению онтогенетического профиля уровня T_3 были посвящены ещё несколько экспериментов (табл. 2). Условия аэрации, температурный (температура не регулировалась и изменялась естественным образом) и световой режим (12Д:12Н), периодичность кормления и плотность посадки были одинаковыми во всех группах.

2.3. Окрашивание препаратов и микроскопия

Личинок и молодь рыб в ходе развития регулярно фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Окрашивали спиртовым раствором ализарина красного согласно общепринятым методикам (Walker, Kimmel, 2007; Depew, 2008). Материал обрабатывали при помощи стереомикроскопов Motic DM143-FBGG, MC-2 ZOOM и Leica EZ4D. Фотографии глоточных зубов выполнены с использованием электронного сканирующего микроскопа Carl Zeiss, Leo 1420. Изображения просветленных препаратов

рыб получены на цифровой камере для микроскопа SCOPETEK DCM510 и Leica EZ4D. Возраст личинок и молоди считали в сутках после оплодотворения (сут).

Таблица 1 Схема проведённых экспериментов по влиянию T_3 (группы ТГ) и тиомочевины (группы ТИО) на темп роста и развитие морфологических признаков.

№ Эксперимента	I	II	III	IV
Группа	Плотва	Плотва	Лещ	Лещ
1. ТГ	1 нг·мл ⁻¹	1 нг·мл ⁻¹	1 нг·мл ⁻¹	1 нг·мл ⁻¹
2. ТГ	-	-	-	5 нг·мл ⁻¹
3. ТИО	0.02%	0.0075%	0.015%	0.015%
4. ТИО	-	0.015%	-	0.02%
5. Контроль	вода	вода	вода	вода

Таблица 2 Схема проведённых экспериментов по изучению онтогенетического профиля уровня T_3 (в эксперименте VI указаны повторности каждой экспериментальной группы).

№ Эксперимента	V	VI
Группа	Лещ	Плотва
1. ТГ	1 нг·мл ⁻¹	1 нг·мл ⁻¹ (2 повторности)
2. ТИО	-	0.015% (2 повторности)
3. Контроль	вода	вода (2 повторности)

На окрашенных и просветленных препаратах изучали следующие признаки фенотипа: общая длина тела (TL), число глоточных зубов и их расположение на глоточных костях, признаки осевого скелета – общее число позвонков (Vt), число позвонков в грудном (Va), переходном (Vi), туловищном (Va+i) и хвостовом (Vc) отделах, число ветвистых лучей в спинном (Db), анальном (Ab), брюшных (Vb) и грудных плавниках (Pb). При изучении развития аппарата глоточных зубов следовали схеме и терминологии, которые были разработаны Накаджимой (Nakajima, 1979, 1984, 1987). Для нескольких рыб одного возраста считали среднюю общую длину тела (TL_M).

2.4. Определение уровня трийодтиронина методом ИФА

Определение концентрации общего трийодтиронина проводили на сыворотке, полученной из крови половозрелых особей плотвы и леща. Рыб регулярно ловили в течение двух лет (с марта 2011-го года по май 2013-го года) ставными сетями в Волжском плёсе Рыбинского водохранилища близ посёлка Борок (58°04'с.ш. 38°16'в.д.). Кровь отбирали из хвостовой артерии и центрифугировали 30 мин при 5000 g, затем отбирали сыворотку, которую замораживали при -20°C до проведения анализа. Анализ образцов проводили по стандартной методике иммуноферментного анализа (ИФА) для коммерческих наборов tT₃ (Monobind Inc., USA). Результаты прочитаны с помощью микрострипового фотометра *Stat Fax 303 Plus* (Awareness Technology, США). Все образцы были проанализированы в дублях, результаты анализа обработаны программой *MasterPlex 2010*. Для определения уровня T_3 в оплодотворенной икре, у личинок и молоди гормон экстрагировали из гомогенатов с помощью лизирующего буфера. Для экстракции T_3 в пробирку с замороженными и предварительно взвешенными образцами наливали лизирующий буфер в объёме кратном массе образца. После гомогенизации образцов и их

центрифугирования (30 мин при 5000 g), супернатант анализировали по стандартной методике для коммерческих наборов.

Состав лизирующего буфера: стандартный фосфатно-солевой буфер (pH 7.4-7.6), детергент Triton X-100 1%, сахараза 0.25M, 6-пропил-2-тиоурацил 1mM (ингибирует активность дейодиназ), коктейль ингибиторов протеаз (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics, Germany). Компоненты лизирующего буфера подобраны на основе других работ, использующих методы иммуноферментного и радиоиммунного анализов (Greenblatt et al., 1989; Parker, Specker, 1990; Leatherland, Barrett, 1993; Biswas et al., 2006).

2.5. Статистические методы анализа

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 8.0. Нормальность распределения значений исследуемых признаков определяли, используя критерий нормальности Колмогорова-Смирнова, дополнительно нормальность распределения данных оценивалась по вероятностным графикам. Вклад факторов в формирование изменчивости T_3 в природных популяциях оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA test). Достоверность различий между распределениями частот формул глоточных зубов в разных группах оценивали, используя двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова. Различия между экспериментальными группами по другим меристическим признакам оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. При парном сравнении линий регрессии (зависимость уровня T_3 от температуры или продолжительности светового дня в природных популяциях) использовали программу Primer of Biostatistics 4.03, основанной на анализе (t -критерий), описанном у Гланца (1998). Данные перед этим и дисперсионным анализом логарифмировали (box-cox трансформация).

Глава 3. Сезонная изменчивость уровня трийодтиронина в природе

В резистентности рыб к низким температурам значительную роль играет гипофизарно-тиреоидная ось (Hoar, Eales, 1963; Little et al., 2013). Изменение уровня ТГ у рыб демонстрирует сезонную цикличность, которую, в основном, связывают с температурным режимом водоёмов и продолжительностью светового дня (Leatherland, 1982). Данные факторы среды наиболее изменчивы в течение года именно в зоне умеренного климата. Для выяснения изменчивости уровня T_3 в плазме крови взрослых особей проведено исследование, в ходе которого был собран и проанализирован материал по сезонной изменчивости. В течение анализа данных, собранных на протяжении более двух лет, обнаружено, что концентрация общего T_3 в плазме крови обоих исследованных видов рыб проявляет сходную динамику (рис. 1).

Статистически значимые положительные корреляции наблюдаются между температурой воды и концентрацией T_3 в плазме крови как у плотвы, так и у леща (рис. 2). Продолжительность светового дня также достоверно коррелирует с уровнем T_3 у обоих видов. Сезонная изменчивость уровня трийодтиронина у исследованных видов сходная. Летом, во время высоких температур воды и продолжительной освещенности в течение суток, что совпадает с периодом интенсивного питания (нагула), наблюдаются максимальные концентрации T_3 . Резкое снижение уровня гормона отмечено осенью-зимой, когда продолжительность дня минимальна, а температура воды падает до десяти градусов и ниже. В этот период снижается активность питания и активность пищеварительных ферментов у большинства видов рыб (Penttinen, Holopainen, 1992; Sánchez-Vázquez et al., 1998; Kuz'mina, Ushakova, 2013).

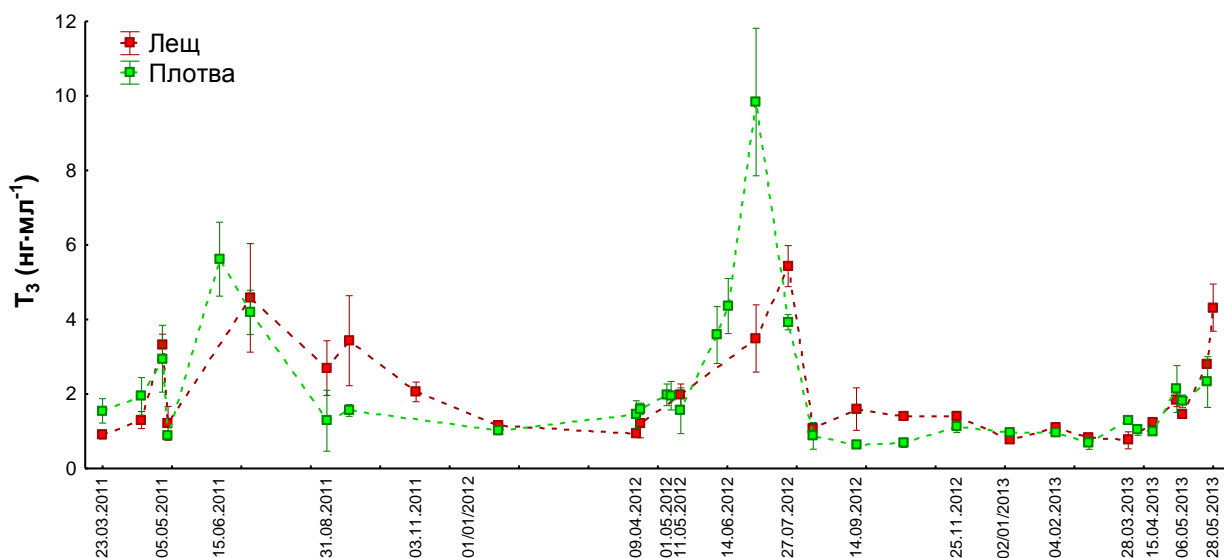


Рисунок 1. Сезонная изменчивость уровня T_3 в плазме крови плотвы и леща из Рыбинского вдхр. Показаны средневыворочные значения и стандартные ошибки средней ($M \pm SEM$).

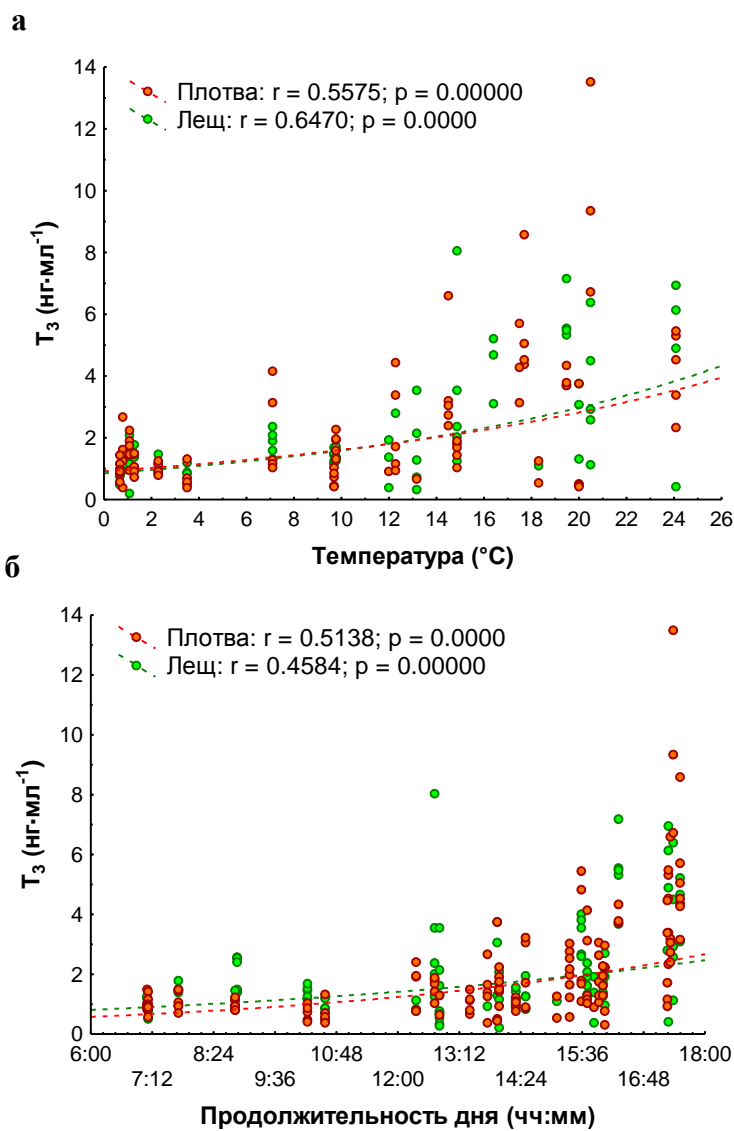


Рисунок 2. Зависимость уровня T_3 от температуры (а) и продолжительности светового дня (б) у плотвы и леща из Рыбинского вдхр.

Повышение уровня T_3 весной в преднерестовый период у исследованных нами рыб согласуется с имеющимися данными о важной роли ТГ в нормальном развитии и созревании гонад у Teleostei (Eales, 1979; Hurlburt, 1977; Leatherland, 1982). Полученные нами результаты по сезонной динамике в целом согласуются с литературными данными по лещу и другим видам рыб из водоемов Франции (Bau, Parent, 2000). Например, для леща из этих водоемов также характерны высокие уровни T_3 летом и в начале осени и их снижение зимой, а пределы варьирования по этому показателю сходны с таковыми для леща из Рыбинского вдхр. Однако в исследовании Бау и Парена (Bau, Parent, 2000) отмечен лишь один пик уровня T_3 за весь годовой цикл, тогда как, по нашим результатам, их может быть несколько. Нами отмечено два-три пика: первый преднерестовый с последующим падением во время нереста и второй летний (иногда отмечается третий - осенний пик).

Многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил достоверные различия между видами по уровню T_3 и значительное влияние факторов температуры и продолжительности освещенности на сезонные колебания уровня T_3 у обоих видов. Однако данный тест не выявил различий по уровню гормона между самками и самцами.

Глава 4. Уровень трийодтиронина в онтогенезе и его влияние на рост плотвы и леща

4.1. Динамика уровня трийодтиронина в онтогенезе при манипулировании тиреоидным статусом

Для изучения динамики уровня трийодтиронина в контроле и экспериментальных группах в процессе раннего развития измеряли концентрацию гормона в икре и тканях личинок и молоди рыб. Также выясняли способность проникновения гормона в икру и поглощения его выклюнувшимися личинками. У рыб, выращиваемых с добавлением гойтрогена, устанавливали возраст, когда происходит снижение уровня гормона, т.е. ингибирование функции щитовидной железы.

Икра и развивающиеся эмбрионы рыб содержат материнские тиреоидные гормоны (Tagawa, Hirano, 1987; Tagawa et al., 1990; Ayson, Lam, 1993). Наши данные (рис. 3) показывают, что оплодотворенные икринки и развивающиеся эмбрионы плотвы и леща содержат количество T_3 (0.09-0.88 нг·мл⁻¹ у плотвы и 0.51-2.04 нг·мл⁻¹ у леща) в пределах диапазона (0.07-9.9 нг·мл⁻¹), определённого для икры других видов рыб (Tagawa et al., 1990). Несмотря на то, что в ранее проведённых исследованиях на других видах рыб уровень ТГ во время инкубации икры был относительно стабилен (Tagawa, Hirano, 1987; Leatherland, 1994; Walpita et al., 2007) плотва и лещ обнаруживают явную тенденцию к увеличению уровня T_3 . Это может объясняться ферментативной активностью монодейодиназ, когда щитовидная железа ещё не развита и синтез эндогенных гормонов не возможен. По всей видимости, наиболее вероятная причина подобного увеличения - конверсия материнского тироксина (T_4) в T_3 , установленная в исследованиях Илса (Eales, 1985) и Дина и Ву (Deane, Woo, 2003).

Динамика концентраций T_3 в группе с добавлением экзогенного ТГ ясно показывает, что данный гормон может эффективно поглощаться эмбрионами из воды (рис. 3а). И хотя одни исследователи полагают, что укрепленная водой оболочка икры (хорион) может выступать в роли барьера для проникновения гормона (Raine et al., 2004), другие утверждают, что это играет незначительную роль (Walpita et al., 2007). Наши данные согласуются с последним предположением.

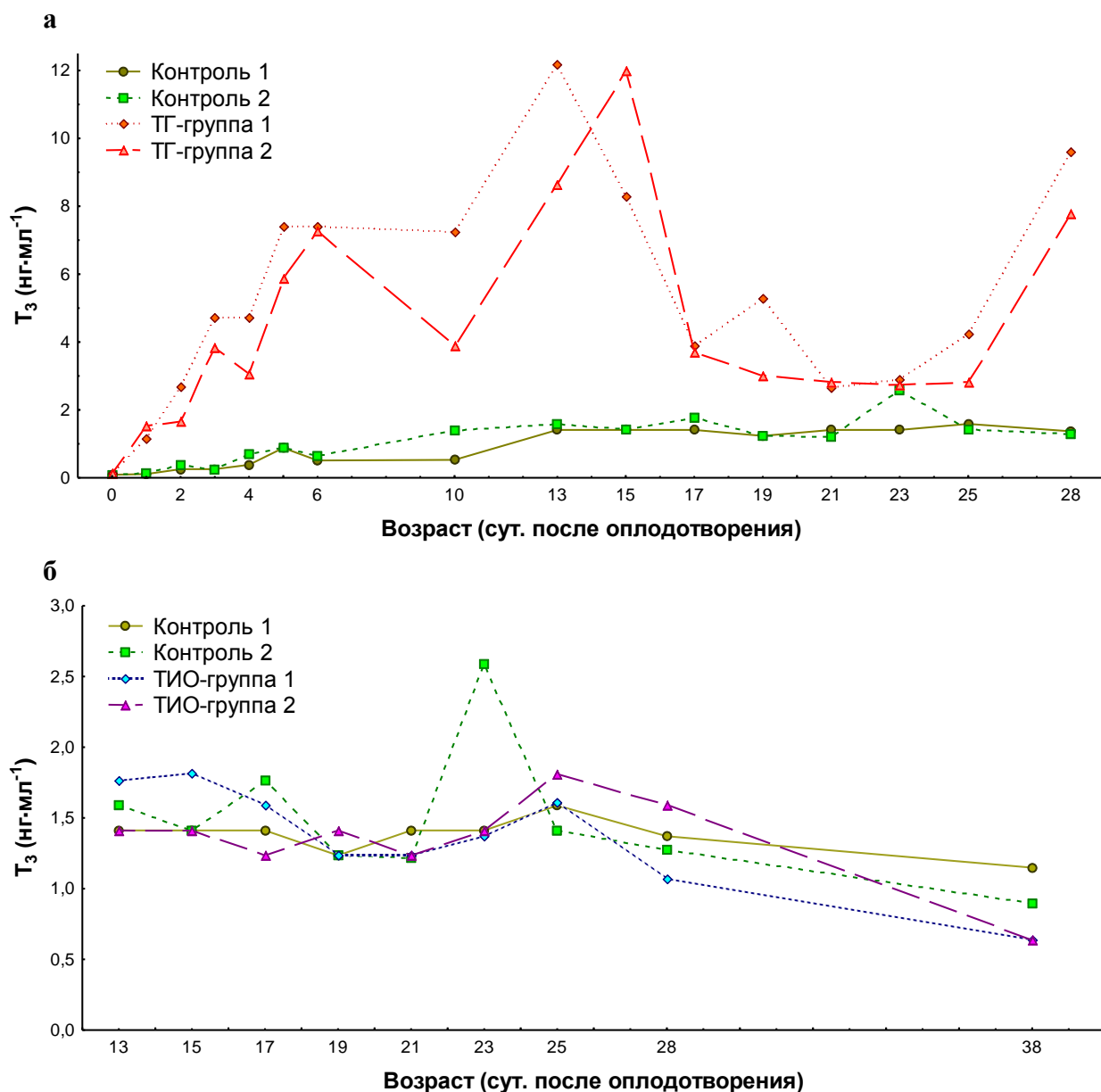


Рисунок 3. Уровень T_3 в процессе раннего онтогенеза плотвы в контроле и под влиянием экзогенного гормона (**а**) и уровень T_3 у развивающейся молоди плотвы в контроле и под влиянием тиомочевины (**б**).

Постоянное воздействие экзогенного T_3 в нашем эксперименте на плотве привело к прерывистому накоплению гормона в тканях экспериментального потомства. Подобные результаты получены и в опытах по воздействию экзогенных ТГ на полосатого данио *Danio rerio* (Walpita et al., 2007) и радужную форель *Oncorhynchus mykiss* (Raine et al., 2004). Вероятно, это свидетельствует о наличии механизмов контроля, в том числе дейодирования и других способов снижения чрезмерного количества T_3 .

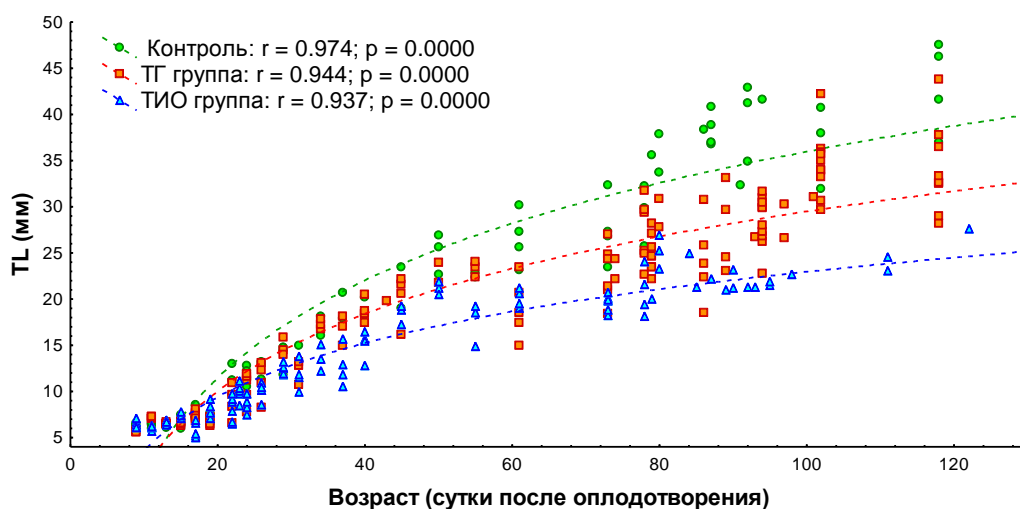
Обработка тиомочевинной плотвы показала, что уровень T_3 в интервале развития с 13 сут по 38 сут слабо отличался от такового у рыб групп контроля. В данном случае необходимо отметить, что в ТИО-группе не наблюдалось повышенных значений гормона, как это было в контроле на 17 сут и на 23 сут. Однако к 38 сут уровень T_3 в обеих группах ТИО показывает явную тенденцию к снижению по сравнению с уровнем T_3 в контроле. Недавние эксперименты с мозамбикской тилапией *Oreochromis mossambicus* показали, что

уровень T_3 значительно снижается у неё только при высоких концентрациях тиомочевины ($300 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и на поздних стадиях развития в возрасте 13-26 дней после вылупления (Hsu et al., 2014). Сходная реакция на воздействие тиомочевинной у видов, относящихся к разным отрядам, говорит об универсальности механизма регуляции синтетической активности щитовидной железы данным гойтрогеном.

4.2. Воздействие уровня тиреоидных гормонов на темп линейного роста плотвы и леща

В исследованиях по влиянию тиреоидных гормонов на темп развития морфологических признаков важной характеристикой является длина, при которой происходит начало или окончание развития того или иного признака. Поэтому важной задачей этого исследования было оценить темп линейного роста рыб из разных экспериментальных групп. В результате опыта выяснено, что особи обоих видов в контроле росли быстрее экспериментальных. Рыбы группы ТГ росли несколько медленнее, наиболее замедленный рост отмечен у рыб, содержащихся в растворе тиомочевинной (рисунок 4). Сравнение линий регрессии показало, что по темпу линейного роста у плотвы достоверно различаются группы контроля и ТГ, контроля и ТИО, а у леща только группы контроля и ТИО.

а



б

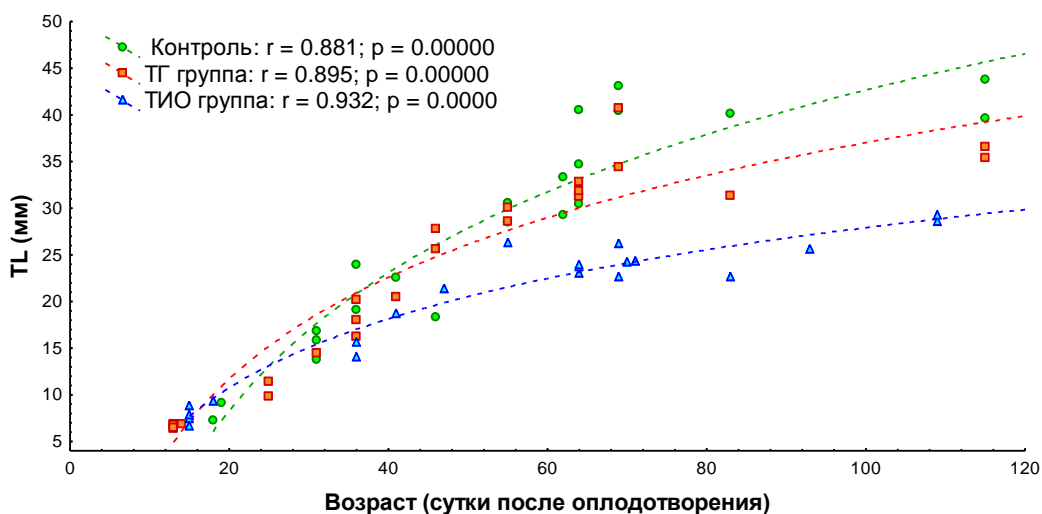


Рисунок 4. Зависимость общей длины от возраста в экспериментальных группах плотвы (а) и леща (б).

Исследования воздействия ТГ на рост рыб проводятся довольно давно. Еще в середине прошлого века на экспериментах с кетой *Oncorhynchus keta* было показано, что инкубация в растворе Т₄ вызывала ускоренный рост эктодермы и мезодермы у эмбрионов, грудных плавников у молоди, но снижала темпы линейного роста тела (Dales, Hoar, 1954). Содержание рыб в растворе тиомочевины также способствовало снижению темпов линейного роста, но не имело заметного влияния на развитие эктодермы и мезодермы у эмбрионов или плавников (Dales, Hoar, 1954). В результате тринадцатинедельной экспозиции молоди толстоголового гольяна *Pimephales promelas* в растворе Т₃ (конц. 12.5; 25 и 50 мкг/л) установлено достоверное снижение темпа линейного роста при максимальной концентрации (Abrahams and Pratt, 2000). Однако ясной дозозависимой связи между концентрацией Т₃ и ростом авторы не смогли выявить.

Вероятно, эффекты экзогенных тиреоидных гормонов на темп роста также зависят от дозы и стадии развития (Huang et al., 1998). Так, некоторые исследования показывают, что ТГ приводят к ускорению линейного роста (Woodhead, 1966; Lam, 1980; Nacario, 1983; Lam, 1985; Lam et al., 1985; Lam and Sharma, 1985; Reddy and Lam, 1992), но высокие дозы гормона имеют негативное влияние на темп роста (Woodhead, 1966; Nacario, 1983; Lam, 1985; Lam and Sharma, 1985; Brown and Kim, 1995).

Глава 5. Влияние уровня трийодтиронина на фенотип исследуемых видов

5.1. Развитие и изменчивость аппарата глоточных зубов у карповых

Карповые рыбы (Cyprinidae) не имеют зубов на челюстях, но обладают хорошо развитыми выростами на 5-й, видоизменённой жаберной дуге, – глоточными зубами. Расположение и число глоточных зубов – довольно стабильный и часто видоспецифичный признак, традиционно используемый в систематике этого обширного семейства (Берг, 1912; Vladykov, 1934; Howes, 1991; Pasco-Viel et al., 2010, 2015). Однако проведённые недавно эксперименты по темпам развития крупного африканского усача *Labeobarbus intermedius* путём манипулирования его тиреоидным статусом показали, что можно вызвать значительные изменения в числе глоточных зубов и даже в числе их рядов (Смирнов, Лёвин, 2007; Shkil et al., 2010).

У плотвы и леща во взрослом состоянии имеется лишь один ряд глоточных зубов по сравнению с тремя рядами у африканского усача (подсемейство Barbinae). Кроме того, плотва характеризуется направленной асимметрией формулы глоточных зубов: большая часть рыб имеют зубную формулу 6-5 (шесть зубов на левой кости и пять на правой). Рыб с двурядными глоточными зубами в природных популяциях плотвы не встречено. У леща глоточные зубы чаще всего однорядные – 5-5 (Решетников, 2003), но встречаются и рыбы с двурядными зубами с одним или двумя зубами в минорном ряду, которых Берг (1949) относил к гибридам леща с густерой *Blicca bjoerkna* L. Однако последующие исследования показали, что лещи с двурядными зубами не являются гибридами (Голубцов, Ильин, 1983). Понимание механизмов, которые контролируют инициирование развития глоточных зубов у карповых рыб, не может быть адекватным без детального изучения паттерна динамики озубления, т.е. времени и порядка появления зубов первого и следующих поколений.

5.1.1. Развитие озубления глоточных костей плотвы

В группе контроля после смены девяти поколений зубов на левой глоточной кости и шести поколений на правой появляются все зубные семейства, свойственные глоточному озублению взрослых особей. Взрослый тип озубления в контроле появляется в возрасте

45-50 сут. В гормональной группе дефинитивное число зубных семейств достигается сменой шести и восьми поколений зубов на левой и правой глоточной костях соответственно. Взрослый тип озубления в ТГ-группе появляется в возрасте 40-45 сут. Число смен поколений глоточных зубов в ТИО-группе было таким же как в контроле, но взрослый тип озубления появился позднее (50-55 сут).

5.1.2. Характер дефинитивного озубления плотвы

Родители экспериментального потомства плотвы имели формулу глоточных зубов 6-5. Распределение формул глоточных зубов в контроле типично для данного вида (табл. 3). Большинство рыб имеют асимметричную формулу 6-5 (94.4%), у остальных особей формула глоточных зубов либо 5-5 (1.4%), либо 6-6 (4.2%). В ТГ-группе произошла редукция числа глоточных зубов по сравнению с таковой в контроле. Типичная формула – 5-5 (74.6%), формула 6-5 отмечена лишь у 2 экз. (1.2%). В ТГ-группе обнаружены также редкие варианты формулы 5-4 и 4-4 (соответственно 20.2 и 4.0%), которых нет в контроле и в ТИО-группе (рис. 5). Согласно двухвыборочному критерию Колмогорова-Смирнова, ТГ-группа достоверно отличается от контроля по распределению частот формул глоточных зубов ($p < 0.001$). У рыб из ТИО-группы, как и в контроле, модальная формула – 6-5. Достоверных различий в распределении частот между этими группами нет. Однако в ТИО-группе отмечена тенденция смещения распределения к формуле 6-6 (более 20% особей). Результаты, полученные в ходе второго эксперимента сходны с таковыми первого эксперимента (табл. 3).

Таблица 3. Распределение вариантов дефинитивных формул глоточных зубов в контроле и экспериментальных группах плотвы.

Группа	n	Варианты формулы				
		4-4	5-4	5-5	6-5	6-6
Эксперимент I						
Контроль	72	-	-	1	68	3
ТГ	173	7	35	129	2	-
ТИО 0.02%	34	-	-	2	25	7
Эксперимент II						
Контроль	17	-	-	-	17	-
ТГ	12	-	4	7	1	-
ТИО 0.0075%	17	-	-	-	15	2
ТИО 0.015%	14	-	-	-	6	8



Рисунок 5. Некоторые варианты дефинитивных формул глоточных зубов плотвы (Эксперимент I): а) контроль, 73 сут, TL 27.3 мм; б) ТГ-группа, 285 сут, TL 51.2 мм; в) контроль, возраст 308 сут, TL 60.5 мм. Справа внизу для каждого варианта дана масштабная линейка – 100 мкм.

5.1.3. Развитие озубления глоточных костей леща

В контроле после смены шести поколений зубов на левой и правой глоточных костях, наблюдаются все пять зубных семейств соответствующих нормальной формуле глоточных зубов леща (5-5). Взрослый тип озубления в контроле появляется в возрасте 45-50 сут. Развитие озубления глоточных костей в ТГ-группе при меньших средних размерах особей происходило быстрее, чем в контроле. Однако проследить до конца развитие озубления в данной группе не удалось. В ТИО-группе для достижения дефинитивного числа зубных семейств требуется смена шести и восьми поколений зубов на левой и правой глоточных костях соответственно. Взрослый тип озубления в ТИО-группе появляется в возрасте 50-55 сут.

5.1.4. Характер дефинитивного озубления леща

У родителей экспериментального потомства леща (Эксперимент III) формулы глоточных зубов были различными: у самца 5-5, а у самки 6-5 (редкий в природных популяциях вариант).

В контроле большинство рыб имели типичную формулу 5-5 (69.6% особей), но помимо этого встречались и двурядные формулы, как с одной стороны 1.5-5 (13%), так и с двух сторон 1.5-5.1 (13%). Все особи ТГ-группы имели формулу с редуцированным числом зубов – 5-4 (табл. 4, рис. 6). В ТИО-группе большинство особей имели увеличенное число зубов, представленное формулами, которые не встречались в других группах 6-5, 1.6-5.1, 2.6-5.2 (78.6%), и лишь одна особь имела типичную формулу 5-5 (7%).

Таблица 4. Распределение вариантов дефинитивных формул глоточных зубов леща в экспериментальных группах (Эксперимент III).

Группы	n	Варианты формулы						
		5-4	5-5	1.5-5	1.5-5.1	6-5	1.6-5.1	2.6-5.2
Контроль	23	1	16	3	3	-	-	-
ТГ	26	26	-	-	-	-	-	-
ТИО 0.015%	14	-	1	-	2	4	4	3

5.1.5. Особенности развития озубления глоточных костей и анализ изменчивости формул глоточных зубов

Первый зуб у личинок плотвы и леща появился в возрасте 9 сут одновременно во всех экспериментальных группах. Как у плотвы, так и у леща после 9 сут в группах ТГ развитие озубления происходило быстрее, чем в контроле, а в группе ТИО плотвы наблюдалось замедление развития начиная с возраста 20 сут, что хорошо согласуется с данными по сравнительной динамике уровня T_3 в тканях экспериментальных особей (рис. 3). В ТИО-группе леща отмечено равномерное отставание развития в течение всего эксперимента. В процессе достижения дефинитивного числа зубов у обоих видов сменяется 8 поколений зубов, а в случае шести зубов у плотвы – 9 поколений. По-видимому, именно различия в темпе развития могли вызвать направленные изменения дефинитивного состояния признака в разных экспериментальных группах. Выявлена видоспецифичность зависимости изменчивости формулы глоточных зубов от T_3 и тиомочевины. В ТГ-группе редукция числа зубов была более сильной у плотвы (формулы 5-4 и 4-4), чем у леща (5-4) при одинаковой концентрации экзогенного T_3 . И наоборот, если у плотвы ТИО-группы (концентрация 0.02%) число зубов не изменялось, либо

добавлялся один зуб справа (частота формулы 6-6 > 20 %), то у леща развитие при добавлении меньшей дозы тиомочевины (концентрация 0.015%) привело к смене модальной формулы главного ряда (6-5 вместо 5-5 в контроле) и частому появлению второго (минорного) ряда с одним-двумя зубами.

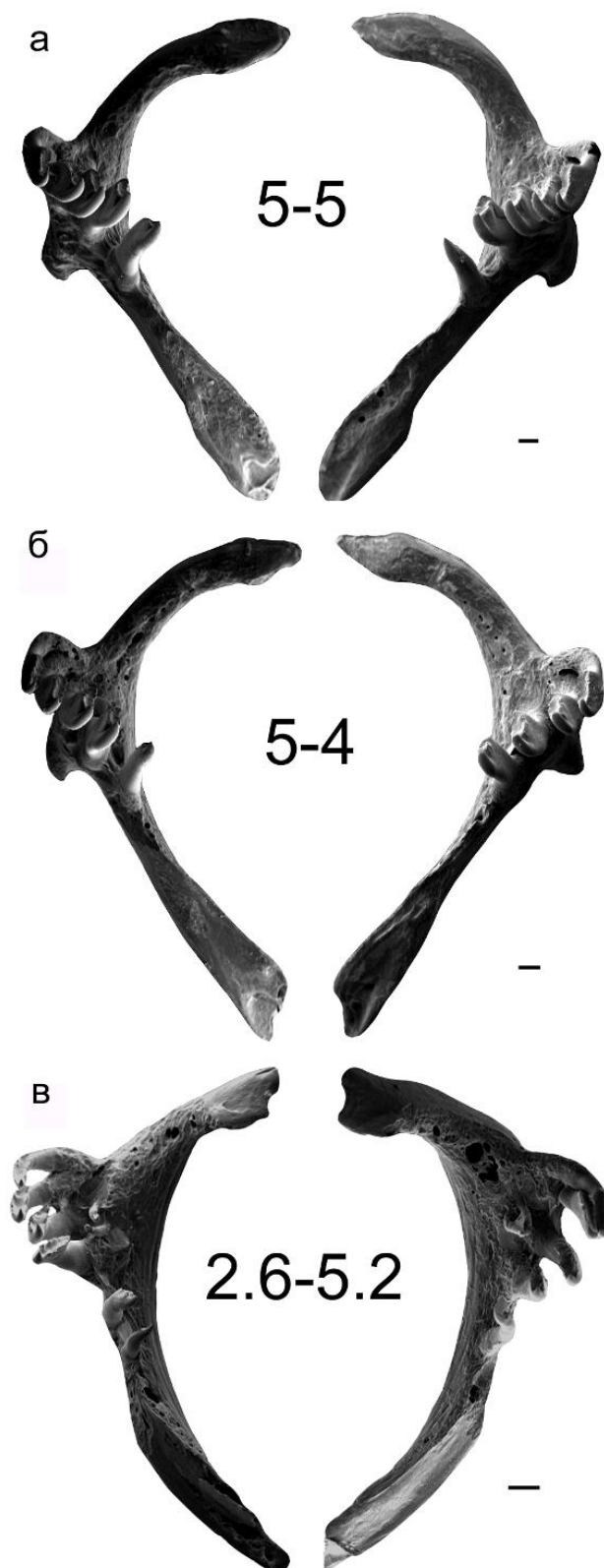


Рисунок 6. Некоторые варианты дефинитивных формул глоточных зубов леща: а) контроль, 156 сут, TL 50.5 мм; б) ТГ-группа, 156 сут, TL 41.8 мм; в) ТИО-группа, 110 сут, TL 28.6 мм. Справа внизу для каждого варианта дана масштабная линейка - 100 мкм.

Изменение числа глоточных зубов у карповых рыб отмечено в ряде экспериментов. Так, у крупного африканского усача *L. intermedius* отмечено уменьшение числа зубов и числа их рядов в подобных гормональных экспериментах (Смирнов, Лёвин, 2007; Shkil et al., 2010). Очевидно, редукция и увеличение числа и рядности глоточных зубов у данного вида также связаны с изменением временных параметров развития озубления глоточных костей.

5.1.6. Классификация развития озубления плотвы и леща, личиночная многорядность Cypriniformes, эволюционные тренды глоточного озубления

У большинства особей плотвы во время раннего онтогенеза зубы на левой глоточной кости развивались по типу В, а на правой по типу D согласно схеме Накаджимы (Nakajima, 1984). У леща с формулой глоточных зубов 5-5 озубление правой и левой глоточных костей также развивается по разным типам (B-D). Такой же тип развития глоточных зубов встречается и у другого представителя подсемейства Leuciscinae – дальневосточной красноперки *Tribolodon hakonensis* с асимметричной формулой главного ряда 5-4 (Nakajima, 1984). Видимо, данный тип развития озубления является базовым для большинства Leuciscinae, а различия в дефинитивной формуле у разных видов связаны со специфическими особенностями финальных стадий развития. При исследовании развития озубления до дефинитивного состояния у леща и плотвы обнаруживаются различия между экспериментальными группами. Так, у плотвы в ТГ-группе и у леща в ТИО-группе на правой глоточной кости озубление идет по типу *Danio rerio* (Van der Heyden, Huysseune, 2000). Этот тип развития представляет собой вариацию типа D, в котором на восьмом поколении добавляется пятый зуб главного ряда. В контроле и ТИО-группе у плотвы и в контроле леща развитие озубления на правой глоточной кости идет по другому варианту типа D, согласно которому пятое зубное семейство добавляется на шестом поколении. На левой глоточной кости у плотвы в контроле и ТИО-группе развитие озубления идет по типу В с добавлением шестого зубного семейства на девятом поколении. Ранние стадии развития озубления леща в ТГ-группе позволяют предположить, что развитие в этой группе также происходит по одному из вариантов B-D типа.

Первичные глоточные зубы у плотвы расположены в 2 ряда (Васнецов, 1939; Чепракова, 1958; Ланге, 1967), а у леща на коротком промежутке развития в 3 ряда (Белогуров, 1948). На отдельных этапах раннего развития озубления глоточных костей плотвы может наблюдаться более двух зубных рядов, как и у других видов карповых рыб (Nakajima, 1984; Nakajima, 1991; Huysseune et al., 1998). Личиночная многорядность глоточных зубов свойственна всем исследованным видам Cyprinidae, Cobitidae и Catostomidae. Часто число личиночных рядов не коррелирует с числом зубных рядов во взрослом состоянии (Weisel, 1967; Nakajima, 1979, 1984, 1987, 1990; Nakajima, Yue, 1989). Подобная личиночная многорядность обусловлена присутствием на глоточной кости зубов разных поколений, или так называемых «волн замены» (replacement wave). Зубы более ранней волны ещё не резорбировались, в то время как зубы, их сменяющие, уже прикрепились.

В нашем случае, многорядность глоточных зубов в раннем онтогенезе плотвы, по всей видимости, является следствием специфичности развития данного признака, и совершенно очевидно, что личиночную многорядность нельзя толковать как рекапитуляцию.

5.2. Осевой скелет

Число позвонков относительно широко варьирует внутри популяций рыб (Swain, Lindsey, 1984). Нередко этот признак используется как в макросистематике, так и в исследованиях внутривидовой структуры карповых рыб (Яковлев, Изюмов, 1982; Изюмов, 1984; Мироновский, 1985; Кожара, 2005). Число позвонков довольно рано определяется в онтогенезе и хорошо наследуется (Кирпичников, 1987), при этом существует экологическая и географическая изменчивость этого признака между разными популяциями (Кожара и др., 1996; 1999). Закономерности изменчивости числа позвонков представляют интерес также для экологии и эволюции (Jordan, 1892; Fowler, 1970; Lindsey, 1975).

Нами исследован эффект регуляции уровня трийодтиронина в течение раннего онтогенеза плотвы и леща на общее число позвонков и их распределение между отделами.

5.2.1. Развитие и изменчивость числа позвонков плотвы

Плотва (Эксперимент I, II). Данные по развитию осевого скелета плотвы получены в Эксперименте I. Кальцинация первых позвонков в контроле наблюдалась в возрасте 13 сут. при средней длине 6.3 мм. В этом же возрасте начинается оссификация позвоночного столба и в группах ТГ и ТИО при средней длине 6.5 и 6.6 мм, соответственно. Все тела позвонков (когда можно подсчитать общее число позвонков по ализариновым препаратам) кальцинируются в контроле в возрасте 24 сут при средней длине 12.5 мм. В ТГ-группе позвоночник оформился раньше - в возрасте 22 сут при средней длине 11.0 мм, а в группе ТИО позже - 29 сут при средней длине 12.4 мм. Отделы позвоночника стали различимыми в контроле в возрасте 31 сут при средней длине 14.8 мм, в группе ТГ - в возрасте 29 сут при средней длине 14.4 мм, а в группе ТИО значительно позже - 40 сут при 15.9 мм. Рыбы ТГ-группы отличались от контроля и ТИО-группы достоверно меньшим числом позвонков в V_t , при этом в Эксперименте I обнаружено статистически значимое уменьшение числа позвонков как в V_a , так и в V_c (табл. 5). В то же время рыбы ТГ-группы и ТИО-группы имели достоверно больше позвонков в V_i , чем рыбы контроля.

Таблица 5. Показатели числа позвонков (средние арифметические) в экспериментальных группах у сеголеток плотвы

Группы	V_a	V_i	V_{a+i}	V_c	V_t
Эксперимент I					
Контроль (n=88)	16.83 ^a	2.99 ^a	19.82	17.41 ^a	41.23 ^a
ТГ (n=195)	16.63 ^b	3.23 ^b	19.86	17.02 ^b	40.89 ^b
ТИО 0.02% (n=56)	16.67 ^{ab}	3.31 ^b	19.98	17.29 ^{ab}	41.3 ^a
Эксперимент II					
Контроль (n=30)	16.69	2.86	19.32	18.14 ^{ab}	41.70 ^a
ТГ (n=23)	16.43	2.87	19.30	17.91 ^a	41.22 ^b
ТИО 0.0075% (n=50)	16.59	2.85	19.43	18.28 ^{ab}	41.74 ^a
ТИО 0.015% (n=36)	16.56	2.76	19.32	18.44 ^b	41.78 ^a

Разными надстрочными буквами показаны группы, статистически различающиеся на уровне $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллиса.

Выполнена оценка встречаемости особей с различными аномалиями осевого скелета – такими как слияние нескольких позвонков и аномалии, связанные с развитием невральных и гемальных дуг (на особях из Эксперимента I). В контроле доля аномальных особей

составила 7.22 %, в группе ТИО – 7.81 %, а в группе ТГ – 9.23 %. Помимо того, в ТГ-группе обнаружены особи (3.59 %) с «четырьмя» преуральными позвонками вместо трех в норме.

5.2.2. Развитие и изменчивость числа позвонков леща

Лещ (Эксперимент III, IV). Производители леща (Эксперимент III) имели одинаковое общее число позвонков (44), но различались по отделам: в Va 14 (♂) и 15 (♀) позвонков, в Vc 20 (♂) и 19 (♀), в Vi по три позвонка. Кальцинация первых позвонков в потомстве у рыб контроля наблюдалась в возрасте 13 сут при средней длине 6.8 мм. В этом же возрасте начинается оссификация позвоночного столба в ТГ-группе и ТИО-группе при средней длине 6.7 и 6.6 мм соответственно. Все тела позвонков (когда можно подсчитать общее число позвонков по ализариновым препаратам) в контроле произошло в возрасте 27 сут при средней длине 12.8 мм. В ТГ-группе позвоночник оформился раньше, в возрасте 25 сут при средней длине 11.4 мм, а в группе ТИО позже - 32 сут при средней длине 12.1 мм. Отделы позвоночника стали различимыми в контроле в возрасте 37 сут при средней длине 21.5 мм, в ТГ-группе заметно раньше - в возрасте 32 сут при средней длине 14.5 мм, а в группе ТИО позже – 42 сут при 18.7 мм. В Эксперименте III рыбы ТГ-группы отличались от контроля достоверно меньшим числом позвонков в Vt, в основном за счёт уменьшения (на уровне статистической тенденции $p = 0.076$) числа позвонков в Vc (табл. 6). Так же как и у плотвы, достоверных различий между контролем и ТИО-группой по признакам осевого скелета не выявлено. В Эксперименте IV число позвонков в Vt и Vc достоверно больше в ТГ-группе относительно ТИО-группы.

Таблица 6. Показатели числа позвонков (средние арифметические) в экспериментальных группах у сеголеток леща

Группы	Va	Vi	Va+i	Vc	Vt
Эксперимент III					
Контроль (n=28)	14.11	3.96	18.07	21.79	43.89 ^a
ТГ (n=33)	13.93	4.03	17.94	21.48	43.42 ^b
ТИО 0.015% (n=16)	14.19	3.81	18	21.94	43.94 ^a
Эксперимент IV					
Контроль (n=29)	14.21	3.72	17.93	22.31 ^{ab}	44.24 ^{ab}
ТГ (n=38)	14.17	3.66	17.83	22.62 ^a	44.47 ^a
ТИО 0.015% (n=25)	14.36	3.62	17.96	22.00 ^b	43.96 ^b
ТИО 0.02% (n=11)	14.60	3.40	18.00	21.80 ^b	43.82 ^b

Разными надстрочными буквами показаны группы статистически различающиеся на уровне $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллиса.

5.2.3. Анализ изменчивости числа позвонков

Основная тенденция влияния ТГ на счетные признаки осевого скелета проявилась в уменьшении общего числа позвонков и числа позвонков в некоторых отделах при добавлении экзогенного Т₃. В экспериментальных работах, посвященных влиянию факторов среды на число позвонков, наиболее важной причиной изменчивости считают температуру и зависящий от неё темп развития в момент определения общего числа позвонков (Павлов, 2007). Гипотезу о том, что темп развития влияет на число позвонков у рыб, высказывал ещё Хаббс (Hubbs, 1926), позднее эту гипотезу экспериментально подтвердил Гарсайд (Garside, 1966). В своих опытах в качестве действующего фактора он

использовал температуру, которая также оказывает влияние на темп развития. При увеличении температуры воды и ускорении темпов развития общее число позвонков уменьшается, а при понижении температуры и замедлении развития – увеличивается. Хотя в нашем эксперименте первые позвонки во всех группах появились в одном возрасте, оссификация позвоночного столба завершилась в разных группах не одновременно. В ТГ-группах формирование общего числа позвонков и детерминация отделов позвоночника завершились раньше, а в ТИО-группах - позже. Т.к. недоразвития позвоночника в группах ТГ не было обнаружено (кроме вариантов с увеличенным числом позвонков в преуральном комплексе), можно заключить, что причиной достоверного уменьшения числа позвонков в этой группе было ускорение темпа развития. Причем, как у плотвы, так и у леща достоверное уменьшение числа позвонков произошло в Vc – отделе, число позвонков которого определяется позднее других отделов позвоночника.

5.2.4. Нарушения развития каудального комплекса под влиянием трийодтиронина

На примере развития беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* (Павлов, 2007) и *Danio rerio* (Bensimon-Brito et al., 2010) известно, что последний преуральный позвонок у взрослых особей формируется в процессе слияния нескольких позвонков – одного преурального PU1 и двух уральных U1 и U2. Причем сначала срастаются PU1 и U1, затем к ним прирастает U2. Такие же данные мы получили по развитию каудального скелета плотвы и леща в наших экспериментах. В ТГ-группе некоторые особи обоих видов обладали «четырьмя» преуральными позвонками, тогда как у карповых рыб их число стабильно и составляет три позвонка. Все особи с аномальным числом преуральных позвонков имели максимальные для своей группы значения Vt. Очевидно, что в случае четырёхпозвонкового преурального комплекса произошло несращение некоторых последних позвонков. Причем несращение трёх позвонков, образующих у взрослых рыб PU1 (первый преуральный или последний позвонок несущий уростиль) происходит в разных комбинациях: [PU1+U1, U2] или [PU1, U1+U2]. Из-за несращения или недоразвития подобные фенотипы можно трактовать как пример пedomорфного состояния признака. В целом из-за ранней детерминации число позвонков подвержено влиянию тиреоидных гормонов несколько слабее по сравнению с признаками более позднего морфогенеза. В основном затрагивается развитие структур осевого скелета, которые относительно поздно формируются в онтогенезе (каудальный комплекс, определение отделов позвоночника, невральные и гемальные дуги).

5.3. Число ветвистых лучей в парных и непарных плавниках

Число лучей плавников – важный таксономический признак, традиционно используемый в систематике рыб (Берг, 1949). Однако, как и другие меристические признаки, они подвержены изменчивости под влиянием внешних факторов. Нами исследован эффект регуляции уровня трийодтиронина на число лучей парных и непарных плавников у исследуемых видов рыб.

Плотва (Эксперимент I). Среднее число Db и Vb рыб ТИО-группы достоверно меньше, чем в контроле (табл. 7). Среднее число Ab и Pб рыб ТИО-группы и ТГ-группы достоверно меньше, чем в контроле. В Эксперименте II достоверно меньшее число лучей отмечено только в Pб у рыб ТГ-группы и ТИО-группы. Заметим, что наибольшее сокращение числа лучей отмечено в грудных плавниках, причем как в ТГ-группах, так и в ТИО-группах. Но если в ТГ-группах сегментация плавниковой складки грудных плавников началась раньше (22-24 сут) и завершилась раньше (45-50 сут), чем в контроле

(26-29 сут и 63-69 сут, соответственно), то в ТИО-группах дифференциация плавниковой складки была замедлена, хотя по достижению рыбами длины 18.1-24.0 мм (средняя 20.1 мм) (75-78 сут), число лучей уже не увеличивалось. Таким образом, редукция числа лучей в P_b в разных экспериментальных группах могла быть достигнута как за счет ускорения развития и преждевременного его окончания (группа ТГ), так и за счет замедления развития (недоразвитие - группа ТИО).

Таблица 7. Изменчивость числа ветвистых лучей плавников (средние арифметические) в экспериментальных группах у сеголеток плотвы

	Db спинной	Ab анальный	P _b грудные	V _b брюшные
Эксперимент I				
Контроль (n=86)	10.05 ^a	10.08 ^a	15.68 ^a	7.99 ^a
ТГ (n=190)	9.88 ^{ab}	9.76 ^b	12.93 ^b	7.76 ^{ab}
ТИО 0.02% (n=42)	9.76 ^b	9.71 ^b	12.71 ^b	7.74 ^b
Эксперимент II				
Контроль (n=27)	9.74	10.21	14.73 ^a	7.93
ТГ (n=23)	9.61	10.09	11.81 ^b	7.82
ТИО 0.0075% (n=49)	9.61	10.39	14.31 ^a	7.79
ТИО 0.015% (n=35)	9.60	10.20	13.40 ^b	7.80

Разными надстрочными буквами показаны группы статистически различающиеся на уровне $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллиса.

Другие парные плавники, брюшные, развивающиеся позднее остальных, в ТГ-группах иногда проявляли максимальную «ТГ-реактивность» (Шкиль, Смирнов, 2009; Шкиль и др., 2010). В частности, при развитии в растворе экзогенного Т₃, у отдельных особей лучи плавников отсутствовали, отмечена также редукция костей тазового пояса (рис. 7).



Рисунок 7. Брюшные плавники плотвы: а) нормально развитые: особь группы ТГ возрастом 55 сут; б) уменьшение числа лучей и редукция тазовых костей: особь группы ТГ возрастом 167 сут; в) полная редукция брюшных плавников и костей тазового пояса: особь группы ТГ возрастом 151 сут. Шкала справа внизу – 1 мм.

Лещ. У леща достоверные различия в среднем числе лучей зафиксированы в группах ТГ и ТИО (табл. 8). В Эксперименте III число ветвистых лучей у рыб ТГ-группы меньше анальном и грудных плавниках, а также у рыб ТИО-группы в грудных плавниках. В Эксперименте IV число лучей достоверно меньше в анальном плавнике в обеих ТИО-группах относительно контроля и ТГ-группы.

Таблица 8. Изменчивость числа ветвистых лучей плавников (средние арифметические) в экспериментальных группах у сеголеток леща

	Db спинной	Ab анальный	Pb грудные	Vb брюшные
Эксперимент III				
Контроль (n=29)	9	24.52 ^a	16.54 ^a	8.11
ТГ (n=33)	9.06	23.16 ^б	13.77 ^б	7.95
ТИО 0.015% (n=19)	9	24.19 ^a	16.33 ^б	8.13
Эксперимент IV				
Контроль (n=29)	9.07	23.96 ^a	13.88	7.91
ТГ (n=37)	9.11	23.49 ^a	13.83	7.55
ТИО 0.015% (n=24)	8.83	22.90 ^б	13.06	7.73
ТИО 0.02% (n=9)	9.11	22.38 ^б	14.33	7.33

Разными надстрочными буквами показаны группы статистически различающиеся на уровне $p < 0.05$ по критерию Краскела-Уоллиса.

Также как у плотвы, наиболее яркий эффект T_3 проявляется у леща на брюшных плавниках (рис. 8).

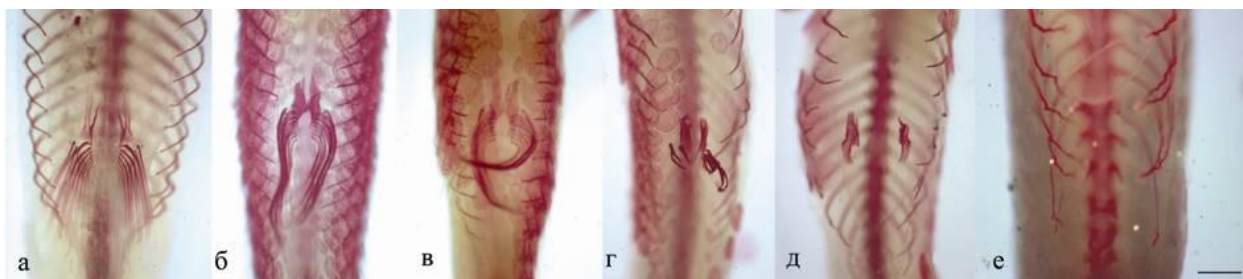


Рисунок 8. Брюшные плавники леща: а) нормально развитые: особь группы контроль 43 сут; б) уменьшение числа лучей, их искривление и редукция тазовых костей: особь группы ТГ возрастом 47 сут; в) уменьшение числа лучей, их искривление и редукция тазовых костей: особь группы ТГ возрастом 52 сут; г) недоразвитие лучей, их искривление и редукция тазовых костей: особь группы ТГ возрастом 50 сут; д) полное отсутствие лучей брюшных плавников и редукция костей тазового пояса: особь группы ТГ возрастом 50 сут; е) полная редукция брюшных плавников и костей тазового пояса: особь группы ТГ возрастом 55 сут; Шкала справа внизу – 1 мм.

5.3.1. Анализ изменчивости числа лучей плавников

Изученные виды демонстрируют зависимость числа лучей от концентрации предъявляемых веществ, регулирующих уровень тиреоидных гормонов в организме. Подобно результатам экспериментов на африканском усаче (Смирнов, Лёвин, 2007; Шкиль, Смирнов, 2009; Шкиль и др., 2010), наши данные показали, что наиболее сильное

влияние экзогенный T_3 оказывает на парные плавники, при этом максимальную реакцию на гормон проявляют плавники с более поздним морфогенезом. У некоторых особей плотвы и леща брюшные плавники и кости тазового пояса были полностью редуцированы. Таким образом, отдельные особи в выборке имеют индивидуальную восприимчивость к воздействию экзогенного тиреоидного гормона.

ВЫВОДЫ

1. В природных популяциях плотвы и леща выявлена сезонная динамика содержания T_3 в сыворотке крови с двумя пиками в преднерестовый и летний периоды, а также двумя минимумами – в зимнее время и нерестовый период. Анализ уровней T_3 и их сезонная изменчивость в природных популяциях показали, что, несмотря на сходный паттерн сезонной изменчивости, между исследуемыми видами обнаруживаются определенные различия по уровню T_3 . Так, плотва имеет более высокий уровень гормона в течение почти всего периода наблюдений.

2. Динамика концентраций T_3 при экспозиции икры и личинок в растворе экзогенного гормона ясно показывает, что данный гормон может эффективно поглощаться и накапливаться эмбрионами плотвы и леща из воды. На определенных этапах онтогенеза отмечается резкое снижение уровня T_3 в экспериментальных группах с добавлением гормона, что свидетельствует о наличии механизмов контроля чрезмерного количества T_3 . Снижение уровня T_3 у плотвы при воздействии гойтрогеном тиомочевинной отмечено в возрасте 20-25 суток после оплодотворения, что может указывать на сроки начала функционирования фолликулов щитовидной железы у этого вида.

3. Повышенный уровень T_3 ускоряет общий темп развития, но несколько замедляет рост. Тиомочевина, создавая дефицит T_3 , замедляет как развитие, так и рост обоих видов.

4. Число глоточных зубов при развитии в растворе экзогенного T_3 редуцировано, а при развитии в растворе тиомочевинной увеличено у обоих видов. При этом у леща значительно увеличивается доля особей с двумя рядами глоточных зубов.

5. Общее число позвонков при развитии в растворе экзогенного T_3 достоверно меньше как у плотвы, так и у леща. Сокращение числа позвонков происходит, в основном, за счет хвостового отдела позвоночника.

6. Число лучей плавников при развитии в растворе экзогенного T_3 у обоих видов редуцировано. У некоторых особей проявляется максимальная реакция на гормон: наиболее поздно закладывающиеся брюшные плавники исчезают, отмечена также редукция костей тазового пояса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Работы, входящие в список ВАК РФ:

1. Болотовский А.А., Лёвин Б.А. 2011. Влияние тиреоидных гормонов на формирование дефинитивной формулы глоточных зубов у плотвы *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes) // Вопросы ихтиологии. Т. 51. № 4. С. 559–568.

2. Болотовский А.А., Лёвин Б.А. 2011. Влияние темпа развития на формулу глоточных зубов леща *Abramis brama* (L): экспериментальные данные // Онтогенез. Т. 42. № 3. С. 172-177.

3. Levin B.A., Bolotovskiy A.A., Levina M.A. 2012. Body size determines the number of scales in cyprinid fishes as inferred from hormonal manipulation of developmental rate // Journal of Applied Ichthyology. Vol. 28. № 3. P. 393–397.

4. **Bolotovskiy A.A.**, Levin B.A. 2015. Thyroid hormone divergence between two closely related but ecologically diverse cyprinid fish species (Cyprinidae) // *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 59, P. 305–310.

5. Levin B.A., **Bolotovskiy A.A.** 2015. Discovery of latitudinal gradient of triiodothyronine concentrations in ectotherms as revealed from a cyprinid fish, the common roach *Rutilus rutilus* // *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 62, P. 128–136.

6. **Bolotovskiy A.A.**, Levin B.A. 2018. Effect of thyroid hormone on the vertebral numbers in two cyprinid fish species (Cyprinidae) // *Journal of Applied Ichthyology* (in press).

Работы, опубликованные в других изданиях:

1. **Болотовский А.А.**, Лёвин Б.А. 2009. Влияние уровня тиреоидных гормонов на состояние морфологических признаков плотвы *Rutilus rutilus* // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экология, эволюция и систематика животных»*. Рязань. С. 304–305.

2. **Болотовский А.А.**, Лёвин Б.А. 2010. Изменчивость формул глоточных зубов плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* (Cyprinidae, Cypriniformes) при развитии в разных режимах скорости онтогенеза (по экспериментальным данным) // *Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов института «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых»*. Москва. С. 46–50.

3. **Болотовский А.А.**, Лёвин Б.А. 2010. Влияние тиреоидных гормонов на личиночное развитие глоточных зубов у плотвы *Rutilus rutilus* (L.) (Cyprinidae, Cypriniformes) // *Тезисы. VIII Международная конференция по раннему онтогенезу рыб и промысловых беспозвоночных*. Светлогорск. С. 15–16.

4. Лёвин Б.А., **Болотовский А.А.**, Лёвина М.А. 2010. Роль гетерохроний в формировании числа счетных элементов посткраниального дермального скелета рыб // *Тезисы. VIII Международная конференция по раннему онтогенезу рыб и промысловых беспозвоночных*. Светлогорск. С. 60–62.

5. **Болотовский А.А.** 2010. Развитие озубления глоточных костей плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и леща *Abramis brama* (L.) в норме и при развитии в разных скоростных режимах онтогенеза // *Материалы XIV Школы-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод»*. Борок. С. 8–13.

6. **Болотовский А.А.** 2012. Влияние гормонов щитовидной железы (трийодтиронин) на формирование фенотипа леща *Abramis brama* (L.) // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экология, эволюция и систематика животных»*. Рязань. С. 198–200

7. **Болотовский А.А.**, Лёвин Б.А. 2012. Сезонная изменчивость уровня трийодтиронина у трёх видов карповых рыб из Рыбинского водохранилища, бассейн Волги // *Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов»*. Борок. С. 54–57.