

4. Меньшиков, М.И. О географической изменчивости сибирского осетра *Acipenser baeri brandt* / М.И. Меньшиков // Доклады АН СССР: Нов. сер. – 1947. – Т. 55, № 4. – С. 371–374.
5. Касимов, Р.Ю. Изменение отношения к свету и температуре некоторых видов осетровых в раннем онтогенезе / Р.Ю. Касимов // Осетровое хоз-во в водоемах СССР – М., 1963. – С. 65–68.
6. Смирнова, Е.Н. Морфоэкологический анализ развития рыб / Е.Н. Смирнова // Труды Института морфологии животных. – 1967. – С. 64–69.
7. Мильштейн, В.В. Совершенствование биотехники разведения осетровых / В.В. Мильштейн. – М.: Пищ. Пром-ть, 1964. – С. 22.
8. Пономарев, С.В. Осетроводство на интенсивной основе / С.В. Пономарев, Д.И. Иванов. – М.: Издат. «Колос», 2009. – 312 с.
9. Алекин, О.А. Основы гидрохимии / О.А. Алекин. – Л.: Гидрометеиздат, 1954. – 296 с.
10. Инструкция по химическому анализу воды прудов. – М.: ВНИИПРХ, 1985. – 46 с.
11. Лурье, Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод СССР / Гидрохимический институт. – Л.: Гидрометеиздат, 1978. – Вып. 1. – 144 с.
12. Поляков, Г.Д. Пособие по гидрохимии для рыбоводов / Г.Д. Поляков. – М.: Пищепромиздат, 1950. – 88 с.
13. Винберг Г.Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб / Г.Г. Винберг. – Минск: Белорусский университет, 1956. – 253 с.
14. Стандартная модель массонакопления рыбы / В.Ф. Резников [и др.] // Тр. ВНИИПРХ. – 1979. – Вып. 2. – С. 182–190.

УДК 597.0/5 – 14

ЭКСПРЕСС-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

М.С. Козий, И.М. Шерман, В.А. Корниенко, В.Ю. Шевченко
Херсонский государственный аграрный университет, Украина
shevchenco@ksau.kherson.ua

EXPRESS-HISTOLOGICAL METHOD MONITORING OF DEVELOPMENT EMBRYONIC OF ACIPENSERIDAE FISHES

Koziy M.S., Sherman I.M., Kornienko V.A., Shevchenko V.J.
Kherson state agricultural university, Ukraine
shevchenco@ksau.kherson.ua

(Поступила в редакцию 21.02.2011 г.)

Реферат. Представлен эффективный метод изучения развития эмбрионов рыб. Перспективы его применения на практике в лабораторных и промышленных условиях показано на рисунке.

Ключевые слова: эмбрионы, рыбы, осетры.

Abstract. The effective method of studying developments embryos of fishes is presented. Perspectives of its application in laboratory practice and industrial conditions is shown.

Key words: embryos, fish, sturgeon.

В рыбных хозяйствах, специализирующихся на инкубировании икры и выращивании молодняка, четко прослеживается результативность их деятельности на фоне учета экологических параметров среды и контроля раннего онтогенеза. Если клинические исследования стадий развития рыб традиционно базировались на общепринятых методах биологического контроля, на сегодняшний момент гистологический мониторинг, проводимый с целью обеспечения нормального физиологического статуса посадочного материала, позволяет получить наиболее объективную информацию относительно состояния развивающегося организма, в связи с чем приобретает исключительное практическое значение.

Работа с эмбриональным материалом включает в себя ряд мероприятий, конечный результат которых зависит от строгого соблюдения определенных правил. Известно, что успех гистологической обработки эмбриональных тканей во многом зависит от качества исходного материала, в связи с чем, в процессе отбора к нему предъявляются достаточно жесткие требования. Для удобства работы, с целью получения достоверных результатов, не следует брать слишком мелкую икру. Забор эмбрионов целесообразно производить в четыре последовательных этапа: дробления, гастрюляции, развития от конца гастрюляции до начала пульсации сердца и от начала пульсации сердца до вылупления из зародышевых оболочек.

С целью своевременной выбраковки некондиционного материала, параллельно с процедурой забора образцов необходимо проводить биологический контроль инкубации икры. Многочисленные наблюдения показывают, что специфический рисунок, образуемый бороздами дробления, как правило, никогда не бывает геометрически правильным. При этом прослеживается зависимость закладки борозд дробления от формы яйца

Согласно представленным данным в яйцах удлиненной формы борозды закладываются почти параллельно первой борозде (или под небольшим углом к ней), образуя при этом характерную фигуру в виде буквы «Ж». В яйцах округлой формы они обычно располагаются по радиусам.

Ассиметричность борозд дробления не является свидетельством патологии развития. Таким образом, от вариантов форм и расположения борозд в дробящемся зародыше следует дифференцировать истинные нарушения дробления.

Если в процессе препарирования зародышей теплокровных позвоночных обычно не возникает каких-либо сложностей, то нетравматическое извлечение живого эмбриона рыбы из яйцевых оболочек не представляется возможным. В этой связи, усовершенствование базовых методов исследований эмбрионального материала является собой весьма сложную и вместе с тем актуальную задачу.

Непосредственно перед тонкой сепарацией зародыша обязательна его фиксация, несколько уплотняющая ткань. Как правило, добавочное уплотнение материала нежелательно, но в данном случае отрицательное свойство фиксатора может оказаться полезным. С учетом того, что эмбрион отделен от яйцевых оболочек тонкой коллоидной прослойкой, плотность фиксированной ткани значительно превосходит плотность геля. В связи с этим представляется возможным достаточно тонко отсепарировать зародышевую ткань. Очевидно также, что тотальная микротомная резка икринки при этом нецелесообразна.

Препарирование икринки с последующим вычленением зародыша выполняется в следующей последовательности:

А. Икринка, не сильно зажата между большим и указательным пальцами, аккуратно разрезается лезвием безопасной бритвы по оси, перпендикулярной анимально-вегетативной. Затем половинки яйца помещаются в чашку Петри с дистиллированной водой.

Б. Некоторое время спустя из верхней половинки необходимо удалить желток следующим образом:

- 1) аккуратно разрыхлить желточную массу препарировальной иглой;
- 2) осторожно сжать пинцетом бока половинки и добиться сепарации желтка;
- 3) перевернув половинку «вверх дном» и приподняв ее пинцетом в толще воды, аккуратно вытрясти из нее желток.

В. Продолжать сжатие половинки в круговом направлении до тех пор, пока не произойдет разрыв рыхлой коллоидной оболочки, соединяющей эмбрион с плотными желточными оболочками.

Отсепарированный эмбрион имеет вид тонкой вогнутой пластинки серого цвета. Прикасаться к нему нужно особенно осторожно, избегая каких-либо усилий и резких движений, так как может произойти повреждение ткани, вплоть до ее фрагментации.

Следует отметить, что данный метод препарирования может быть применен к эмбрионам, находящимся на первых трех этапах развития. На этапе, предшествующем вылуплению из зародышевых оболочек, эмбрион полностью огибает икринку по экватору, поэтому ее разрезание нужно выполнять со стороны анимального полюса перпендикулярно оси тела.

Выполнять все операции нужно очень аккуратно и в случае нарушения целостности зародышевой ткани необходимо все повторить заново.

Парафин-целлоидиновая методика заливки является наиболее подходящей для гистологической обработки эмбриональных тканей рыб [3, 4, 5]. Дополнительно был разработан экспресс-метод заливки тканей, специально адаптированный для эмбрионов рыб. Сущность его заключается в том, что дегидратация зародышевой ткани выполняется при помощи диоксана.

Общая схема гистологической обработки эмбрионов с применением нового экспресс-метода достаточно упрощена:

1 – Фиксация: 4–5% нейтральный формалин или реактив Буэна, 20–30°C;

2 – Обезвоживание: диоксан, 3 мин.;

3 – Интермедиатор (осветлитель): О–ксилол, 3 мин., при 30°C;

4 – Заливка в парафин: смесь (парафин (85–90%); ланолин (10–15%)), 5 мин., при 61–62°C;

5 – Охлаждение: вода, 3 мин., 10–15°C; формирование блоков;

6 – Резка на микротоме;

7 – Расправление (дистиллированная вода, при комнатной температуре), наклейка и сушка срезов;

8 – Депарафинизация: О–ксилол, 0,5–1,0 мин., при комнатной температуре;

9 – Замещение О–ксилола: этанол (96–100%), 0,5–1,0 мин., при комнатной температуре;

10 – Замещение этанола: вода, при комнатной температуре;

11 – Окраска: гематоксилин Гейденгайна или Эрлиха, 1–1,5 мин., при комнатной температуре;

12 – Промывка: водопроводная вода, 1,0 мин.;

13 – Осветление: О–ксилол, 0,5 мин., при комнатной температуре;

14 – Заключение: канадский бальзам.

Результат применения нового экспресс-метода в отношении эмбрионов рыб представлен на рисунке 1.

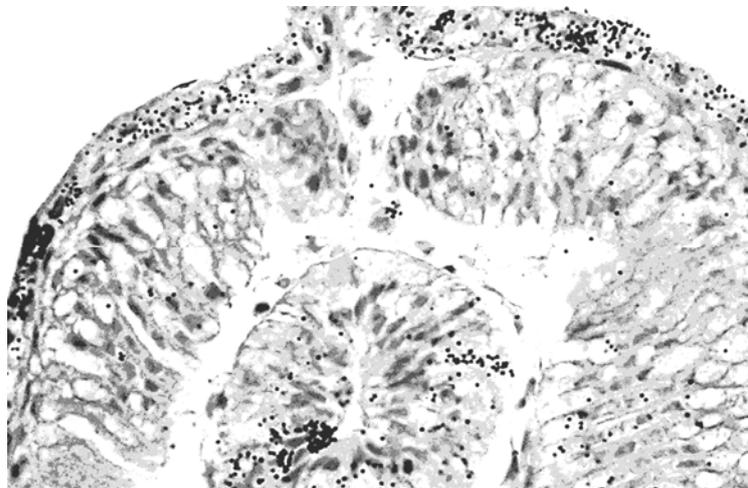


Рисунок 1. Поперечный срез эмбриона осетра русского (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt et Ratzeburg, 1833).

Большим преимуществом предлагаемого экспресс-метода является быстрота его исполнения: время отбора, препарирования, фиксации, проводки и заливки зародышевого материала в уплотнительную среду составляет всего 2 часа 15 минут, в то время как обработка эмбрионов рыб классическими методами выполняется в течение 72 часов [2]. Полученные таким образом гистосрезы отличаются хорошей сохранностью и малой толщиной (порядка 3 мк), что особенно важно при их микроскопировании с применением иммерсионных систем.

Исходя из вышесказанного можно заключить, что предлагаемый метод экспресс-обработки эффективен в отношении эмбриональных тканей рыб и может быть рекомендован к использованию как в лабораторной практике, так и в промышленных условиях.

Представленные фактические данные представляют очевидную теоретическую заинтересованность и практическую значимость. Поскольку современные и перспективные технологии разведения рыб базируются на глубоких знаниях особенностей онтогенеза, становится очевидным, важным аспектом информированности специалиста является изучение эмбриогенеза рыб на фоне хода стадий развития. Окончательное и объективное гистологическое заключение открывает реальные возможности повысить управляемость искусственного воспроизведения, а также развить и усовершенствовать практику охраны редких и исчезающих видов рыб.

Список использованных источников

1. Детлаф, Т.А. Развитие осетровых рыб / Т.А. Детлаф, А.С. Гинзбург, О.И. Шмальгаузен. – М.: Наука, 1981.
2. Основы гистологии и гистологической техники / В.Г. Елисеев [и др.]. – М.: Медицина, 1967.
3. Козій М.С., Шерман І.М., Корнієнко В.О. та ін. Спосіб комбінованого залиття тканин гідробіонтів. Патент на корисну модель № 15588 від 17.07.2006 р. (бюл. № 7).
4. Apati A. Einführung in die mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Acad. Veil. Leipzig, 1955.
5. Peterfi H. Methodic der wissenschaftlichen. Biology. Springer. Widen, 1988.