

На правах рукописи

САПОЖНИКОВА Юлия Павловна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУХОВОГО
САККУЛЯРНОГО АППАРАТА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ ОЗЕРА
БАЙКАЛ В СВЯЗИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ИХ ОБРАЗА ЖИЗНИ**

03.02.06 - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск - 2016

Работа выполнена на базе лаборатории ихтиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент,
с.н.с. отдела ультраструктуры клетки
ФГБУН Лимнологический институт СО РАН
Клименков Игорь Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, доцент, с.н.с.
кафедры зоологии позвоночных ФГБОУ ВО Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова
Голубева Татьяна Борисовна

доктор биологических наук, в.н.с., руководитель группы
сенсорных систем рыб лаборатории поведения низших
позвоночных ФГБУН Институт проблем экологии
и эволюции имени А.Н. Северцова РАН
Барон Владимир Давыдович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Защита состоится « 27 » мая 2016 г. в « 15.30 » часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.53 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 12, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, аудитория « 389 ».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте <http://istina.msu.ru/dissertations/19108231/>.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 12, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра ихтиологии, тел.: +7 (495) 939-25-38.

Автореферат разослан « 21 » марта 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.И. Куга

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. При формировании сложных форм поведения у животных, отличающихся средой обитания, роль отдельных органов чувств различна (Винников, 1966; Павлов, Касумян, 1991). Восприятие звуковых стимулов у разных видов рыб неодинаково из-за различий в морфологии их сенсорного слухового саккулярного эпителия и форм карбонатного отолита (Протасов, 1978; Luchakov, Rebane, 2000; Popper et al., 2005). До сих пор немногие исследователи связывали макро- и ультраструктуру слухового аппарата с функциональными параметрами слуха рыб (Хуе, Peterson, 2006; Smith et al., 2011). Несмотря на имеющиеся к настоящему времени данные об особенностях морфологической организации акустико-гравитационной системы рыб, актуальным остается вопрос о морфологических коррелятах разных уровней их акустической чувствительности в связи с поведением и экологией.

Озеро Байкал является естественной моделью обитания рыб в разнородных экологических условиях от уреза воды до максимальных глубин (Талиев, 1955). Известно, что объективный поиск ультраструктурных основ сенсорной чувствительности оптимален у генетически близких видов (Девицина, Эль-Саид Эль-Аттар, 1989), различающихся условиями обитания. Это позволяет считать группы байкальских рогатковидных (Cottoidei) и сиговых (Coregonidae) рыб, обитающих в разных условиях, наиболее адекватными объектами исследования адаптивных особенностей сенсорной слуховой системы. Эволюционная история и экология этих рыб хорошо изучены (Скрябин 1969; Сиделева, 1982, 2014; Смирнова, 1997; Кирильчик, 1998; Sideleva, 2003; Богданов, 2004; Суханова, 2004; Мельник и др., 2009; Смирнов и др., 2009; Sukhanova et al., 2012; Клименков и др., 2013).

Важным аспектом является то, что дивергенция сиговых рыб по нишам, по-видимому, происходила неоднократно на протяжении того же самого промежутка времени в плейстоцене, что и у рогатковидных рыб, внутри одного и того же водоема. Рогатковидные рыбы озера Байкала представляют группу филогенетически близких видов, которые образовались от одной или нескольких пресноводных предковых форм не ранее 2,5 млн лет назад (Талиев, 1955; Кирильчик, 1998). Общий предок байкальского омуля *Coregonus migratorius* Georgi, 1775 и байкальского сига *Coregonus baicalensis* Dybowski, 1874 появился в озере также не менее миллиона лет назад: время симпатрической дивергенции между ними составляет около 10 тысяч лет, а аллопатрической между этими видами и сигом-пыжьяном *Coregonus pidshian* Gmelin, 1789 не менее 1 млн лет (Суханова, 2004; Смирнов и др., 2009; Sukhanova et al., 2012; Vychenko et al., 2014). Еще одна важная особенность – многоуровневая структура внутривидового фенотипического полиморфизма сиговых рыб, разделенных внутри одного вида в пространстве и времени на морфо-экологические группы (МЭГ), популяции и субпопуляции, а также большое разнообразие видов у рогатковидных рыб, обусловленные многочисленностью ниш в глубоком олиготрофном водоеме. Большое экологическое сходство и сопряженность эволюционных изменений у рогатковидных и сиговых рыб Байкала имеет особое значение при сравнительных исследованиях адаптивных особенностей их сенсорной слуховой системы, поскольку полиморфизм сиговых рыб при освоении ими глубоководного водоема выступает как альтернатива узкой специализации и видовому разнообразию рогатковидных рыб (Кирильчик, Слободянюк, 1997; Смирнов, 2009; Vychenko et al., 2012, 2014).

Цель исследования – изучить ультраструктурные и функциональные особенности периферического отдела слуховой системы байкальских рыб, обитающих в различных условиях акустической среды.

В рамках этой цели поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить ультраструктурные особенности саккулярного эпителия (типы волосковых клеток, распределение, специфику морфологической поляризации рецепторного аппарата) у разных видов байкальских рыб.

2. Провести сравнительный анализ морфологических особенностей периферического отдела слухового анализатора у разных рогатковидных и сиговых видов байкальских рыб, проследить зависимость выявленных различий с их поведенческой активностью.

3. Выявить возможные пути адаптации органов слуха у байкальских рыб к прибрежному и пелагическому образу жизни

4. Изучить особенности формирования и химический состав отолитов разных форм при участии слухового саккулярного эпителия у разных видов байкальских рыб.

5. Провести анализ функциональных возможностей сенсорной слуховой системы (диапазонов максимальной акустической чувствительности, порогов слухового восприятия, дирекционной чувствительности саккулюса) у разных видов байкальских рыб.

Научная новизна. Впервые приводится детальное описание и сравнительный анализ морфологических и физиологических особенностей слухового саккулярного аппарата отдельных видов рыб, принадлежащих к разным экологическим группам. По строению саккулярного аппарата у представителей байкальской ихтиофауны на современном этапе исследований имеются только данные автора диссертации. Впервые определены диапазоны слуховой чувствительности сенсорного аппарата у байкальских рогатковидных и сиговых рыб. Для анализа поведения и акустической чувствительности рыб впервые был адаптирован программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный Институтом автоматизации и электрометрии СО РАН (Патент №70105, 2008; Программа для регистрации и анализа поведения животных..., 2008). Полученные экспериментальные данные впервые сопоставлены с результатами электронно-микроскопического изучения строения слуховой системы байкальских рыб. Показано, что особенности слуховой чувствительности, ориентации в пространстве и акустического поведения сиговых и рогатковидных рыб обусловлены особенностями макро- и ультраструктуры их акустического аппарата. У рыб, занимающих разные экологические ниши, отмечена значительная вариация в организации сенсорного слухового эпителия. Предполагается, что разнородные морфотипы волосковых клеток могут отвечать на частоты разных диапазонов. Экспериментально показано, что волосковые клетки с короткими стереоцилиями преимущественно настроены на более высокие частоты. Установлено, что для слухового эпителия рыб мелководной зоны озера Байкал характерно наличие волосковых клеток с преимущественно короткими стереоцилиями, воспринимающими более высокочастотные звуковые колебания, которые легче идентифицируются на фоне низкочастотного шума в прибрежной зоне. Для пелагических видов характерны большие площади на макуле, занимаемые волосковыми клетками с удлинёнными стереоцилиями, что, в свою очередь, способствует наиболее адекватному восприятию низкочастотных акустических

волн. Впервые показано, что дирекционная чувствительность саккулюса и особенности морфологической поляризации волосковых клеток у рогатковидных и сиговых рыб предопределяются особенностями их акустического поведения. Предполагается, что на особенности ориентации волосковых клеток саккулюса влияют особенности акустической среды обитания данного вида рыб. Показано, что содержание родительских и гибридных форм сиговых рыб в идентичных условиях аквариумного комплекса, начиная с самых ранних этапов онтогенеза, позволяет идентифицировать признаки, обусловленные наследственными изменениями, приобретенными в процессе симпатрического видообразования или в результате гибридизации. Наблюдаемое сходство ультраструктурных особенностей сенсорного эпителия сиговых рыб природных популяций и полученных методом искусственного оплодотворения в контролируемых условиях Центра коллективного пользования «Пресноводный аквариумный комплекс» (ЦКП ПАК) ЛИН СО РАН свидетельствует о том, что данный признак генетически закреплен.

Практическая ценность работы. Данная работа актуальна в связи с возросшим за последние несколько лет воздействием на слух рыб антропогенных звуков. Для анализа возможного влияния акустического загрязнения на рыб необходимы данные о морфофункциональных особенностях их слуховой системы, которая в этом отношении является наиболее уязвимой. Поскольку на долю рогатковидных рыб приходится до 70-80% всей рыбопродукции озера Байкал (Талиев, 1955; Сиделева, 1982; Сиделева, Козлова, 2010), знание их особенностей имеет также практическую ценность. Изучение физиологии и закономерностей поведения эндемичных байкальских сиговых рыб также представляет особую значимость, поскольку озеро Байкал является исходной точкой видообразования рыб рода *Coregonus*. Работа имеет также инновационную перспективу. Байкальские сиговые рыбы, в частности, байкальский омуль – не только ключевой вид в экосистеме озера Байкал, но и основной промысловый вид, учет численности которого ведется в ЛИН СО РАН с помощью тралово-акустических работ. Для точной оценки распределения популяций в пространстве и времени необходимо знание акустической чувствительности исследуемых видов. Изучение механизмов адаптации сиговых рыб к условиям обитания имеет решающее значение для прогнозирования того, каким образом животные будут реагировать в условиях глобальных кризисов. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе студентов кафедры физиологии человека и животных биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», а также могут быть применены для подготовки учебных пособий по ихтиологии, сенсорной физиологии, гидробиологии и экологии. Результаты работы использованы при составлении научно-исследовательских отчетов по проектам: РФФИ №05-04-97265-р-байкал-а, РФФИ №07-04-00121-а, РФФИ №08-04-01434-а, РФФИ №13-04-10148-к, РФФИ №13-04-10041-к, РФФИ №14-04-01242-а, РФФИ №15-05-10169-к, интеграционный проект СО РАН №6, проект РАН №10, бюджетная тема ЛИН СО РАН № VI.50.1.4 (№ 0345-2014-0002).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для слухового эпителия рыб мелководной зоны озера Байкал характерно наличие волосковых клеток с преимущественно короткими стереоцилиями, воспринимающими более высокочастотные звуковые колебания, которые легче идентифицируются на фоне низкочастотного шума в прибрежной

зоне. Для саккулярной макулы пелагических видов характерны большие площади, занимаемые клетками с удлинёнными стереоцилиями, что способствует наиболее адекватному восприятию низкочастотных акустических волн.

2. Особенности морфологической поляризации слухового саккулярного аппарата байкальских рыб являются следствием специфики акустической среды их обитания. Дирекционная чувствительность саккулюса обусловлена особенностями морфологической поляризации его волосковых клеток и предопределяет особенности акустического поведения рыб.

3. Форма и размер отдельных оттоконий отолита предопределяют диапазон и особенности дирекционной слуховой чувствительности у разных видов рыб, что, в свою очередь, влияет на поведенческую активность этих рыб в различных условиях окружающей звуковой среды.

4. У рогатковидных беспузырных рыб максимальная акустическая чувствительность находится в более низкочастотном диапазоне по сравнению с пузырьными сиговыми рыбами, что предопределяется морфологией саккулярного аппарата, в частности, отсутствием у рогатковидных рыб плавательного пузыря и наличием волосковых клеток с высокими стереоцилиями.

Личный вклад автора. Автор непосредственно участвовал в планировании и проведении работы, получении и обработке данных, интерпретации полученных результатов. Автору принадлежит формулировка и решение поставленных задач, обобщение результатов и обоснование применённых научных методов. Гибриды сиговых рыб получены и выращены в ЦКП ПАК совместно с Л.В. Сухановой, О.Ю. Глызиной, В.М. Яхненко, А.А. Белоус, Т.В. Беломестных. В работе по определению слуховой чувствительности байкальских рыб использованы алгоритмы качественного и количественного анализа поведения рыб на основе программно-аппаратного комплекса EthoStudio, разработанные В.А. Куликовым (Институт автоматизации и электрометрии СО РАН, г. Новосибирск). Данные по химическому составу и структуре отолитов байкальских рыб получены совместно с Ю.Л. Михлиным и А.С. Романченко (Институт химии и химической технологии СО РАН, г. Красноярск).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на I и II Всероссийских научно-практических конференциях «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2003, 2010), IV, V и VI Верещагинских конференциях (Иркутск, 2005, 2010, 2015), Международной конференции, посвященной 100-летию юбилею члена-корр. АН СССР, проф. Г.Г. Винберга, XIII Международном совещании и VI школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006), IX и X Съездах Гидробиологического общества РАН (Тольятти, 2006; Владивосток, 2009), III Международной конференции молодых ученых «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution» (Одесса, 2007), IX Международной конференции «Pattern Recognition and Image Analysis: New Information Technologies» (Нижний Новгород, 2008), Молодежной конференции «Молодежь и наука Забайкалья» (Чита, 2008), Всероссийской конференции с международным участием «Водные экосистемы: трофические уровни и проблемы поддержания биоразнообразия» (Москва, 2008), Экспертном семинаре «Биоразнообразии планеты: действительность и перспективы» (Иркутск, 2011), Всероссийской конференции «Математическое моделирование и вычислительно-информационные технологии в междисциплинарных научных исследованиях» (Иркутск, 2011), Всероссийской конференции с международным участием

«Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013), V Всероссийской конференции «Поведение рыб» (Борок, 2014), XII Международном симпозиуме «International Symposium on the Biology and Management of Coregonid Fishes» (Иркутск, 2014).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 30 печатных работах, включая 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 160 страницах, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы (286 источников, 160 из которых на иностранных языках) и приложения. Работа содержит 8 таблиц и 58 рисунков, включающих 98 микрофотографий.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю – к.б.н., с.н.с. отдела ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН, доценту И.В. Клименкову за поддержку, оказанную на всех этапах выполнения работы. Автор признателен зав. лабораторией ихтиологии ЛИН СО РАН к.б.н. Е.В. Дзюба, сотрудникам лаборатории ихтиологии ЛИН СО РАН – И.В. Ханаеву, к.б.н. Сухановой Л.В., к.б.н. С.В. Кирильчику, к.б.н. О.Г. Смирновой, к.б.н. А.М. Мамонтову, к.б.н. В.М. Яхненко, к.б.н. М.Л. Тягун, Т.В. Беломестных, И.А. Небесных, И.Н. Смолину, Белоус А.А., а также к.б.н. Н.Г. Мельник, безвременно ушедшей из жизни. Автор благодарен сотрудникам Приборного центра «Электронная микроскопия» Объединенного Центра ультрамикрoанализа – К.Ю. Арсентьеву, В.И. Егорову, А.П. Лопатину, А.В. Тькову, М.М. Масленниковой, зав. отделом ультраструктуры клетки д.б.н. Е.В. Лихошвай за предоставленную возможность работы в Приборном центре. Автор признателен рук. группы ЦКП ПАК к.б.н. О.Ю. Глызиной, сотрудникам лаборатории гидрологии и гидрофизики ЛИН СО РАН М.М. Макарову и К.М. Кучеру за помощь в постановке эксперимента по изучению акустической чувствительности байкальских рыб, а также к.б.н. Ю.С. Букину за помощь в статистической обработке данных. Особую благодарность автор выражает Институту автоматизации и электрометрии СО РАН (г. Новосибирск) и лично к.т.н. В.А. Куликову за разработку программы EthoStudio, которая использовалась при исследовании акустической чувствительности рыб; Институту химии и химической технологии СО РАН (г. Красноярск) и лично д.х.н. Ю.Л. Михлину и к.х.н. А.С. Романченко за помощь в обработке результатов работы при исследовании отолитов рыб с использованием методов РФЭС и АСМ. Автор сердечно благодарит команды НИС и группу подводного мониторинга ЛИН СО РАН за помощь в сборе материала, а также сотрудников Байкальского филиала ФГУП Госрыбцентр (г. Улан-Удэ) и филиалы ОАО «Востсибрыбцентр» за помощь в организации и проведении экспериментальных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведены сведения о степени изученности слуховой рецепции рыб, проведен анализ методических подходов, используемых для изучения сенсорной слуховой системы и акустической коммуникации рыб. Описаны морфологические и функциональные свойства слуховой системы рыб, механизмы стимуляции слуховых рецепторов, роль слуха в акустическом поведении рыб. Дана краткая характеристика исследованных видов рогатковидных и сиговых рыб озера Байкал.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Количество и характеристика материала

Для изучения межвидовых отличий в ультраструктуре сенсорного слухового эпителия выбраны значительно отличающиеся образом жизни:

– четыре вида рогатковидных рыб: каменная широколобка *Paracottus knerii* Dybowski, 1874 – донная рыба, встречающаяся в прибрежной и склоновой зонах озера и наиболее многочисленная на глубинах до 40-50 м; северобайкальская желтокрылка *Cottocomephorus alexandrae* Taliev, 1935 – бентопелагическая рыба, обитающая в присклоновой зоне и предпочитающая глубины от 10 до 250 м; большая голомянка *Comephorus baicalensis* Pallas, 1776 и малая голомянка *Comephorus dybowski* Korotneff, 1904 – вторично пелагические рыбы, заселяющие всю водную толщу открытых районов озера до максимальных глубин и совершающие вертикальные сезонные и суточные миграции (Талиев, 1955; Коряков, 1972; Стариков, 1977) (табл. 1);

– три вида сиговых рыб: байкальский омуль пелагической и придонно-глубоководной МЭГ, мелководный озерно-речной сиг, или сиг-пыжьян, байкальский сиг, а также гибриды баргузинского сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂, искусственно полученные в контролируемых условиях ЦКП ПАК ЛИН СО РАН (табл. 2).

Представители рогатковидных рыб. Отлавливали разноячейными жаберными сетями и сачками в процессе водолазных работ в марте-июне 2004-2007 гг. в Южном Байкале в районе истока р. Ангара и у мыса Березовый, а также в июне-октябре 2008 г. у пос. Большие Коты (Южный Байкал). Для исследования отбирали половозрелых особей, возраст определяли по количеству опаковых и гиалиновых зон отолита.

Таблица 1. Характеристика рогатковидных рыб, использованных для исследования.

Вид	Пол, общая зоологическая длина (TL), мм	Возраст (по отолитам), лет	Глубина лова, м	Кол-во рыб, экз.
большая голомянка	♀, 149±1.09	3+	150-200	25
	♂, 143±0.42	2+ – 3+	150-200	25
малая голомянка	♀, 114±1.93	2+ – 3+	150-200	23
	♂, 129±0.83	2+	150-200	27
северобайкальская желтокрылка	♀, 117±0.64	2+ – 3+	3-15	32
	♂, 113±0.40	3+	3-15	18
каменная широколобка	♀, 119±2.31	2+ – 5+	1-6	15
	♂, 112±0.64	3+ – 4+	1-6	35

Представители сиговых рыб. Для исследования использовались отловленные с помощью разноячейных жаберных сетей в августе-октябре 2013 г. в районе Малого моря озера Байкал особи байкальского омуля пелагической и придонно-глубоководной МЭГ и байкальского сига, а также особи сига-пыжьяна, взятого во время нереста в октябре 2014 г. на реке Белая Усольского района Иркутской области. Кроме того, анализировались полученные методом искусственного оплодотворения в контролируемых условиях ЦКП ПАК особи байкальского омуля придонно-глубоководной МЭГ, сига-пыжьяна р. Баргузин, чивыркуйского байкальского сига и гибридов первого поколения (F1) баргузинского сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля (придонно-глубоководной МЭГ) ♂.

Таблица 2. Характеристика сиговых рыб, использованных для исследования.

Вид	Пол, общая зоологическая длина (TL), мм	Возраст (по отолитам), лет	Глубина лова, м	Кол-во рыб, экз.
байкальский омуль (природная популяция)	♀, 310±4.45	7+ – 10+	200–350	35
	♂, 292±8.23	8+ – 9+	200–350	21
байкальский омуль (ЦКП ПАК)	♀, 116±4.86	0+ – 4+	–	19
	♂, 113±3.55	0+ – 4+	–	21
гибрид сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ (ЦКП ПАК)	♀, 160±1.39	2+	–	24
	♂, 139±2.27	2+	–	16
сиг-пыжьян (природная популяция)	♀, 290	7+	0–20	1
	♂, 260±5.00	7+	0–20	2
сиг-пыжьян (ЦКП ПАК)	♀, 195±7.98	0+ – 4+	–	16
	♂, 160±5.42	0+ – 4+	–	16
байкальский сиг (природная популяция)	♂, 535±8.83	7+	0–200	2
байкальский сиг (ЦКП ПАК)	♀, 158±3.25	0+ – 4+	–	20
	♂, 149±2.51	0+ – 4+	–	22

2.2 Методы электронной микроскопии для исследования сенсорного слухового эпителия

Непосредственно после вылова у рыб с вентральной стороны вскрывали черепную коробку, удаляли головной мозг, обнажали ушные капсулы, с помощью пинцета извлекали правый и левый лабиринты и отделяли саккулюс вместе с сагиттой (отолитом). Саккулярный мешочек с отолитом фиксировали в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) 3 часа, промывали тем же буфером в течение 5 мин, дофиксировали 1%-ным раствором осмия 12 часов, обезживали в ряду возрастающих концентраций этанола (30%, 50%, 70%, 98%) по 10 минут в каждой концентрации, высушивали при критической точке на аппарате Balzers CPD 030, сенсорный эпителий напыляли золотом и исследовали с помощью сканирующих электронных микроскопов Philips 525M (Голландия) и Quanta 200, FEI Company (США). Для работы с помощью трансмиссионного электронного микроскопа LEO 906 E (Германия) саккулярный эпителий под бинокляром отделяли от отолитов, после фиксации заливали в эпоксидную смолу и с помощью ультрамикротомы (Leica ultracut R, Австрия) получали срезы толщиной 70 нм.

Для морфометрического анализа сенсорного эпителия выполнено от 30 до 50 фотоснимков каждой макулы с шагом, равным 30 мкм. Длину, ширину и площадь макулы, длину киноцилий и стереоцилий, а также угол морфологической поляризации (расположение стереоцилий и киноцилии одной клетки относительно rostrocaudальной и dorsoventральной осей макулы) рассчитывали с помощью программы Image-Pro Plus. Длину каждой макулы измеряли от ее рострального участка до каудального, ширину макулы определяли для трех ее участков – рострального, центрального и каудального. Процентное соотношение площадей разных зон макулы рассчитывали относительно ее общей площади. Для классификации волосковых клеток использовали кластерный метод анализа, в частности, методы k-средних и иерархической кластеризации, с применением программы Statistica 8.0. Количественный показатель сходства волосковых клеток, принадлежащих к одному кластеру, рассчитывали исходя из длин киноцилий и максимальной длины стереоцилий.

2.3 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС) отолитов

Исследованы образцы сакулярных отолитов рогатковидных рыб (большой голомянки, каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки) и байкальского омуля. Информация об энергии связи (ЭС) линии кальция и преобладающей модификации карбоната кальция в образцах получена методом рентгенофазового анализа цельных отолитов. Записывались спектры обеих сторон отолитов арагонитовой и ватеритовой разновидностей. Измерения проводились на фотоэлектронном спектрометре SPECS (SPECS GmbH, Германия), укомплектованном энергоанализатором электронов PHOIBOS HSA3500 150 MCD9 при возбуждении излучением линии Al K α (1486.6 эВ). Для учета электростатической подзарядки образцов как внутренний стандарт использовали линию C 1s (ЭС – 285.0 эВ) слоя углеводородных загрязнений, а в нескольких экспериментах линию Au 4f_{7/2} (84.0 эВ) напыленного золота. Запись и обработку спектров проводили при помощи пакетов лицензионных программ SpecsLab и CasaXPS. Спектры рентгеновского поглощения (C K-, O K-, N K-, Ca L-края) получены на оборудовании Российско-Германской лаборатории на BESSY-II в режиме измерения полного тока утечки (TEY мода).

2.4 Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) при исследовании топографии отолитов

Образцы сакулярных отолитов рогатковидных рыб (большой голомянки, каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки) и байкальского омуля, предварительно зафиксированные по описанной выше методике (см. Главу 2.2), изучали методом АСМ в полуконтактной моде с помощью мультимодового сканирующего зондового микроскопа Solver P-47 (НТ-МДТ, Москва) со сканером 14 мкм (сканирование образцом) на воздухе при комнатной температуре. В качестве зонда использовали кремниевый кантилевер с резонансной частотой около 200 кГц. Изображения (256x256 точек) получали при скорости сканирования 1.5-2 Гц, одновременно записывали изображения рельефа и фазового контраста, из них вычитали кривые второго порядка. На каждом образце изучали несколько разных областей, по возможности в разных масштабах изображений (от 5 до 0.5 мкм).

2.5 Экспериментальная методика определения слуховой чувствительности рыб

Для изучения поведения и сенсорной экологии байкальских рыб на базе ЛИН СО РАН создан аквариумный комплекс (Глызина и др., 2011, 2012, 2013) и совместно с институтом Автоматики и электротриии СО РАН (г. Новосибирск) разработана мобильная экспериментальная установка на основе программы EthoStudio (Куликов и др., 2010, 2014; Куликов, 2010; Киричук, Куликов, 2011; Куликов, Сапожникова, 2011). Тестовые эксперименты для разработки алгоритмов анализа поведения рыб при их акустической стимуляции проведены с одиночными половозрелыми особями байкальского омуля посольской популяции, а также с группой особей (по 5 и 10 штук), содержащихся в течение 3 месяцев на Большереченском и Селенгинском рыбодоводных заводах при температуре 4,2°С и нормальном кислородном режиме.

Для определения диапазонов акустической чувствительности у рогатковидных и сиговых рыб использовали условно-рефлекторный метод. Для выработки условного рефлекса на звук по 30 особей каждого вида содержали при ежедневной стимуляции разночастотным звуком до 1,5 месяцев (октябрь-ноябрь) при одновременном пищевом подкреплении (совпадающий рефлекс). Звук в эксперименте подавался с

помощью подводного громкоговорителя UW-30 Electro-Voice с рабочими частотами 100 Гц-100кГц и усилителя мощности. Аппаратура для измерения амплитуды звукового давления сигналов и контроля их формы включала откалиброванный пьезокерамический гидрофон ТС4013, усилитель, осциллограф АКИП 4113/1, модуль АЦП Е14-440, вольтметр Meterman 34XDMM. Для исключения выработки условного рефлекса на временной интервал между сочетаниями звук/безусловный стимул его произвольно изменяли от 1 до 5 с, фиксируя поведение рыб в течение 10-30 с перед и после каждого опыта. Показано, что у байкальских рыб условный рефлекс на звук вырабатывается после 25-30 сочетаний акустического сигнала и его пищевого подкрепления. Эксперименты проводились в 30 повторностях для отдельного вида на каждой из тестируемых частот от 100 Гц до 5 кГц (через каждые 100 Гц) при громкости звука от 0 до 160 дБ (через 5 дБ, относительно 1 мкПа). Для определения диапазонов максимальной чувствительности использовался тест «открытое поле», в котором двигательная активность рыб (единичной особи и в стае) регистрировалась на цифровую видеокамеру HDR-НС5 после подачи звуковых сигналов разной частоты, на которые ранее был воспитан условный рефлекс. Полученные видеофайлы анализировались с помощью программного комплекса EthoStudio. О чувствительности рыб к звуковому сигналу судили визуально и по созданным в программе EthoStudio картам плотности вероятности и активности особей в зоне подачи пищи и наличию положительной реакции рыб на определенный акустический сигнал без пищевого подкрепления (активные перемещения, рывковые движения). В качестве контроля тестировали поведение рыб без звукового воздействия. Статистическая обработка полученных слуховых порогов производилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе R.

В эксперименте по изучению частотной избирательности волосковых клеток саккулярного эпителия гибридов сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂, наиболее хорошо адаптированным к искусственным условиям содержания, в течение 24 часов подавался интенсивный тональный звуковой сигнал (с частотой 3000 Гц интенсивностью 160 дБ). Опыт проводился в 6 повторностях, включая 3 контрольных эксперимента без подачи звукового сигнала. После интенсивной стимуляции у опытных и у контрольных особей сенсорный эпителий фиксировали по ранее описанной методике (см. Главу 2.2) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 200, FEI Company (США).

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУХОВОГО САККУЛЯРНОГО АППАРАТА У РОГАТКОВИДНЫХ РЫБ (СОТТОИДЕИ)

3.1 Ультроструктура волосковых клеток саккулярного эпителия

Саккулярная макула у исследованных видов располагается на медиальной стороне отолитового органа, имеет вытянутую форму и ориентирована в rostroкаудальном направлении (табл. 3). В состав макулы входят волосковые (рецепторные, или сенсорные) клетки и опорные клетки - микровиллярные эпителиоциты. Численность волосковых клеток на единицу поверхности сенсорного эпителия выше в ростральном и каудальном участках макулы, в центральной зоне макулы клетки располагаются на значительном расстоянии друг от друга, особенно у голомянок. Апикальная поверхность каждой волосковой клетки увенчана пучком из 10-30 стереоцилий и ацентрично расположенной киноцилии. Стереоцилии располагаются 4-6 правильными рядами, отстоящими от киноцилии.

Таблица 3. Морфологические показатели саккулярной макулы байкальских рогатковидных рыб.

Виды	Площадь макулы, мм ²	Отношение площади макулы к средней длине (TL) особей в выборке	Плотность расположения волосковых клеток в макуле (количество клеток на 1 мм ² , $M \pm m$)	Доля макулы, занимаемая разными типами волосковых клеток, %*					
				к13с9	к9с8	к14с4	к8с4	к9с2	к11с1
большая голомянка	0.27±0.001	0,0018	28100±1232	0	53	0	47	0	0
малая голомянка	0.24±0.001	0,0020	27600±511	0	67	0	33	0	0
северобайкальская желтокрылка	0.09±0.001	0,0008	46000±795	0	0	0	77	23	0
каменная широколобка	0.33±0.003	0,0030	34400±358	18	14	11	26	22	9

* Примечание. Цифры в названии типов клеток (к13с9, к9с8, к14с4, к8с4, к9с2, к11с1) обозначают среднюю длину киноцилии (к) и среднюю длину наиболее высокой стереоцилии (с) в мкм.

Расстояние между стереоцилиями в одном ряду у изученных видов рыб составляет 0.43 ± 0.001 мкм, что меньше, чем расстояние между стереоцилиями в соседних рядах – 0.85 ± 0.002 мкм. Диаметр апикальной поверхности у волосковых клеток, расположенных по периферии макулы, составляет 2.40 ± 0.075 мкм, что в два раза меньше, чем у волосковых клеток в центре макулы (3.73 ± 0.050 мкм). Диаметр постепенно сужающихся к основанию стереоцилий колеблется от 0.32 мкм до 0.15 мкм, диаметр киноцилий – от 0.44 мкм до 0.25 мкм.

Кластерный анализ дал возможность объединить волосковые клетки саккулюса рогатковидных рыб в классы таким образом, чтобы в один класс попали максимально схожие. Наиболее значимыми признаками при объединении клеток в разные кластеры отмечены длина киноцилии (к) и длина максимальной стереоцилии в рецепторном аппарате одной клетки (с). Эти характеристики, более всего варьирующие у всех изученных видов рыб, были взяты за основу обозначения типов волосковых саккулярных клеток (табл. 3). У голомянок выделено два типа клеток (к9с8, к8с4), у северобайкальской широколобки – два типа (к8с4, к9с2) и у каменной широколобки – шесть типов (к13с9, к9с8, к14с4, к8с4, к9с2, к11с1), где цифрами приведены длины киноцилий (к) и максимальных стереоцилий (с) в микрометрах (мкм). Таким образом, с применением кластерного анализа для рогатковидных рыб обнаружено 6 типов клеток (рис. 1, табл. 3). Рассчитана площадь, занимаемая на макулах полями волосковых клеток разного типа (рис. 2). Соотношение таких полей (в %) для рогатковидных рыб приведено в таблице 3. У описанных видов доминируют разные типы клеток, частотная избирательность которых отличается в зависимости от длины стереоцилий: волосковые клетки с короткими стереоцилиями более восприимчивы к высокочастотным колебаниям, чем волосковые клетки, имеющие длинные стереоцилии. Для пелагических видов (большая и малая голомянки) характерны большие по площади (более 50%) участки в макуле, занимаемые клетками с удлинёнными стереоцилиями (8 мкм).

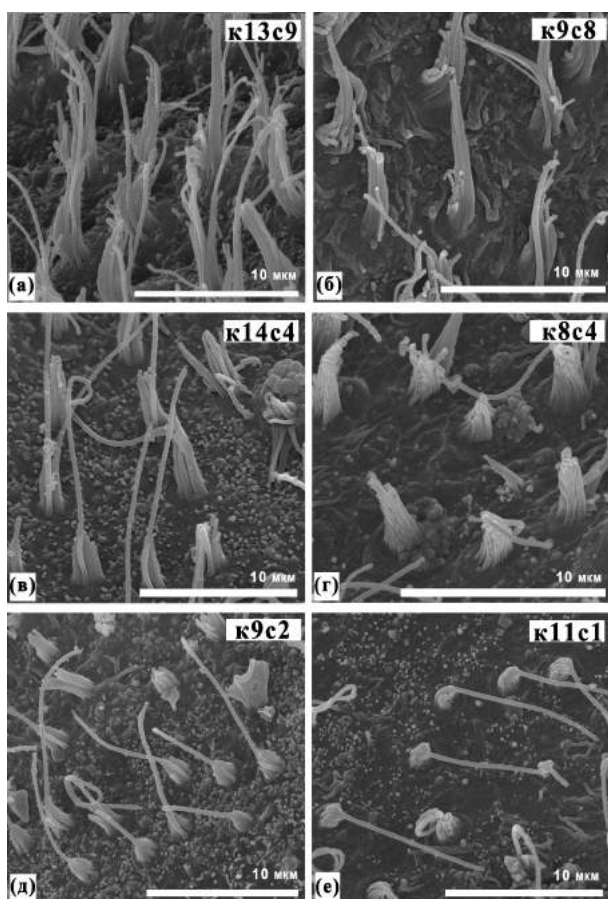


Рисунок 1. Волосковые клетки с разной длиной стереоцилий и киноцилии в саккулярной макуле у рогатковидных рыб: k13c9 (а), k9c8 (б), k14c4 (в), k8c4 (г), k9c2 (д), k11c1 (е), где к – средняя длина киноцилии, мкм; с – средняя длина максимальной стереоцилии, мкм. СЭМ Philips 525M.

В макуле прибрежной каменной широколобки и обитающей в присклоновой зоне северобайкальской желтокрылки по площади доминируют участки с волосковыми клетками, несущими более короткие стереоцилии (≤ 4 мкм) – 100% и 68% соответственно. Преобладание у голомянок волосковых клеток с длинными стереоцилиями, вероятно, связано с акустическими условиями, наблюдающимися в местах обитания этих рыб и способствует восприятию ими низкочастотных звуковых колебаний. Акустический диапазон в пелагиали представлен в основном низкочастотными звуками – до

300 Гц (Карлик, Марапулец, 2004). Такие звуки затухают слабее, чем высокочастотные, и поэтому в условиях пелагиали распространяются на большие расстояния. Высокочастотная компонента в акустическом диапазоне открытой пелагиали водоемов практически отсутствует (Урик, 1978).

В отличие от пелагиали, прибрежная зона характеризуется шумами с широким диапазоном частот от 0.05 до 16 кГц (Карлик, Марапулец, 2004). Благодаря наличию таких акустических источников, как волноприбойное воздействие, неоднородность рельефа, высокая плотность бентосного населения, акустический диапазон прибрежной зоны насыщен высокочастотными звуковыми колебаниями, которые лучше, чем низкочастотные, распространяются в мелководной зоне водоемов и имеют для многих водных животных сигнальный характер. Именно этой особенностью прибрежья объясняется то, что у каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки в макуле преобладают волосковые клетки с короткими стереоцилиями. Волосковые клетки такого типа обеспечивают лучшую восприимчивость этих рыб к высокочастотным звуковым сигналам, легче идентифицируемым на фоне низкочастотного шума прибрежной зоны (Урик, 1978). Низкочастотный шум от прибоя создает излишний шумовой фон, который способен скрыть коммуникативные акустические сигналы (Урик, 1978). Именно поэтому типичные обитатели прибрежной зоны должны иметь адаптации, направленные на высокодифференцированное восприятие биологически значимых акустических сигналов в условиях шума. У каменной широколобки к такого рода адаптациям можно отнести не только большие по площади участки макулы, занятые волосковыми клетками с короткими стереоцилиями, но и относительно большую общую площадь макулы, большое морфологическое разнообразие типов волосковых клеток и их высокую плотность (табл. 3).

3.2 Особенности дирекционной чувствительности саккулюса

На представленных схемах морфологической поляризации волосковых клеток макулы рогатковидных рыб сохранена ее нативная форма (рис. 2), которая близка форме желоба *sulcus acoustics* соответствующего отолита. Размеры всей макулы и отдельных зон с разной ориентацией пучков даны схематически. Каждая макула при описании подразделена на ростральную, каудальную и центральную зоны, которые соответствуют направлениям к ростральному и каудальному концам рыбы. Под ориентацией и направлением (морфологической поляризацией) волосковых клеток макулы понимается расположение киноцилии (к) относительно стереоцилий (с) рецепторного аппарата одной клетки. Горизонтальная ориентация волосковой клетки предполагает направленность её рецепторного аппарата по рострокаудальной оси макулы и рыбы соответственно; вертикальная ориентация - по дорсовентральной оси. Рассчитано процентное соотношение участков с разной ориентацией волосковых клеток относительно всей макулы, на основе которого построены диаграммы дирекционной чувствительности саккулюса в сагиттальной плоскости. У прибрежного бентического вида каменной широколобки и у бентопелагического вида северобайкальской желтокрылки отмечено доминирование вертикальной ориентации волосковых клеток и, соответственно, чувствительности саккулюса к смещениям отолита в вертикальном направлении. Подобную тенденцию можно увидеть на саккулярной макуле у бентических рыб: пятнистого гурами *Trichogaster trichopterus* (Popper, Coombs, 1982), мормировых рыб рода *Gnathonemus* (Popper, Coombs, 1982), золотой рыбки (Saidel et al., 1995) и у бычка-буйвола *Taurulus bubalis* (Lovell et al., 2005). Для частично связанных с дном рыб – сигов *Coregonus clupeaformis* (Popper, Coombs, 1982), налимов *Lota lota* (Popper, 1981) и атлантической трески (Dale, 1976) - характерна разнонаправленность волосковых клеток макулы как в вертикальном, так и в горизонтальном направлениях. Подобная разнонаправленность клеток макулы свойственна также для бати- и абиссобентальных угрей группы *Elopomorph* (Buran et al., 2005), а также для морских мурен рода *Gymnothorax* (Popper, 1979), которые являются активными хищниками-засадчиками и большую часть времени проводят, затаившись в укрытиях. Такая особенность макулы, вероятно, связана с тем, что всем вышеперечисленным рыбам необходимо чувствовать малейшие колебания донных организмов и совершать в условиях препятствий рассчитанные движения (Лычаков, 1994, 2002). На макуле голомянок горизонтальная ориентация волосковых клеток превалирует над вертикальной, также как доминирует чувствительность саккулюса к смещениям отолита в горизонтальном направлении. Голомянки, обитающие в толще воды, несмотря на вертикальные миграции, ведут малоподвижный образ жизни и недостаточно тесно связаны с дном, следовательно, потребность в анализе сильных рывковых ускорений уменьшается (Кожова и др., 1979; Сиделева и др., 1992; Лычаков, 1994, 2002; Мамонтов и др., 2004). Схемы морфологической поляризации у голомянок отличаются от описанных ранее у мезопелагических брегмацеровых рыб рода *Bregmaceros* (Popper, 1980) и мерлузовых рыб рода *Merluccius* (Lombarte et al., 1992), для саккулярной макулы которых, однако, также характерно доминирование горизонтальной ориентации волосковых клеток.

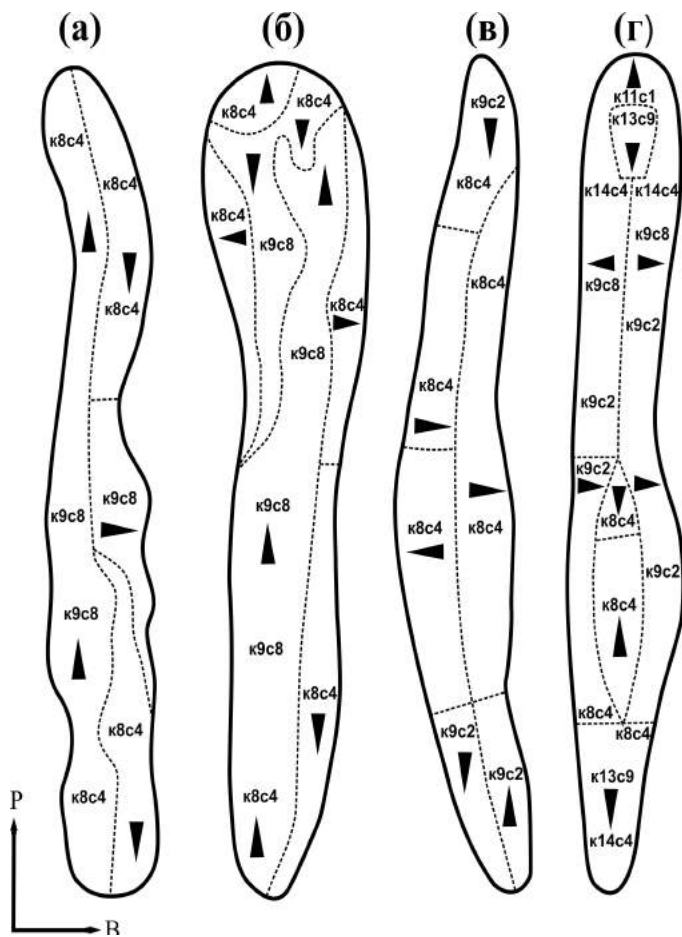


Рисунок 2. Схемы распределения волосковых клеток разного типа в саккулярной макуле и их морфологической поляризации у большой голомянки (а), малой голомянки (б), северобайкальской желтокрылки (в), каменной широколобки (г). По данным СЭМ Philips 525M. Пунктирной линией нанесены зоны макул с разной морфологической поляризацией волосковых клеток, вектор поляризации указан стрелкой. Р - ростральная сторона макулы, В - вентральная сторона макулы. (↓) - вектор поляризации (от стереоцилий к киноцилии).

Схемы морфологической поляризации у голомянок отличаются от описанных ранее у мезопелагических брегмацеровых рыб рода *Bregmaceros* (Porrer, 1980) и мерлузовых рыб рода *Merluccius* (Lombarte et al., 1992), для саккулярной макулы которых, однако, также характерно доминирование горизонтальной ориентации волосковых клеток.

ГЛАВА 4. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУХОВОГО САККУЛЯРНОГО АППАРАТА У СИГОВЫХ РЫБ (COREGONIDAE)

4.1 Ультраструктура волосковых клеток саккулярного эпителия

У байкальских сиговых рыб макро- и ультраструктура слухового сенсорного эпителия также является видоспецифичной (табл. 4).

Таблица 4. Морфологические показатели саккулярной макулы сиговых рыб.

Виды	Площадь макулы, мм ²	Отношение площади макулы к средней длине (TL) особей в выборке	Плотность расположения волосковых клеток в макуле (количество клеток на 1 мм ² , $M \pm m$)	Доля макулы (%), занимаемая разными типами волосковых клеток*							
				к6с5	к11с4	к5с4	к4с3	к7с2	к6с2	к3с2	к2с2
байкальский омуль	1.63±0.009	0,0053	571500±8975	31	13	0	0	32	0	24	0
гибрид сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂	0.45±0.006	0,0030	498700±3005	0	0	21	19	0	36	24	0
сиг-пыжьян	1.80±0.009	0,0065	379200±4854	0	0	0	43	0	6	0	51
байкальский сиг	0.16±0.003	0,0010	236400±3486	0	0	0	24	0	16	21	39

* Примечание. Цифры в названии типов клеток (к6с5, к11с4, к5с4, к4с3, к7с2, к6с2, к3с2, к2с2) обозначают среднюю длину киноцилии (к) и среднюю длину наиболее высокой стереоцилии (с) в мкм.

С помощью кластерного анализа по наиболее значимым и варьирующим признакам – длина киноцилии (к) и длина наиболее высокой стереоцилии (с) у сиговых рыб выделено 8 типов волосковых саккулярных клеток (цифры обозначают длину киноцилии и наибольшей стереоцилии в мкм) (рис. 3). У байкальского омуля выделено четыре типа волосковых клеток (к3с2, к11с4, к6с5, к7с2), у гибридов сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ – четыре типа (к3с2, к5с4, к4с3, к6с2) и у сига-пыжьяна – два типа клеток (к4с3, к2с2), где цифрами приведены длины киноцилий (к) и максимальных стереоцилий (с) в мкм.

Деление макулы у одного конкретного вида на зоны с разными типами волосковых клеток не всегда совпадает с делением этой макулы на зоны с разной морфологической поляризацией клеток, также описанной для сиговых рыб (рис. 4). Площадь макулы, плотность расположения волосковых клеток, их разновидности, а также длина киноцилий и стереоцилий неодинаковы у сиговых рыб, обитающих в различных экологических условиях озера (табл. 4).

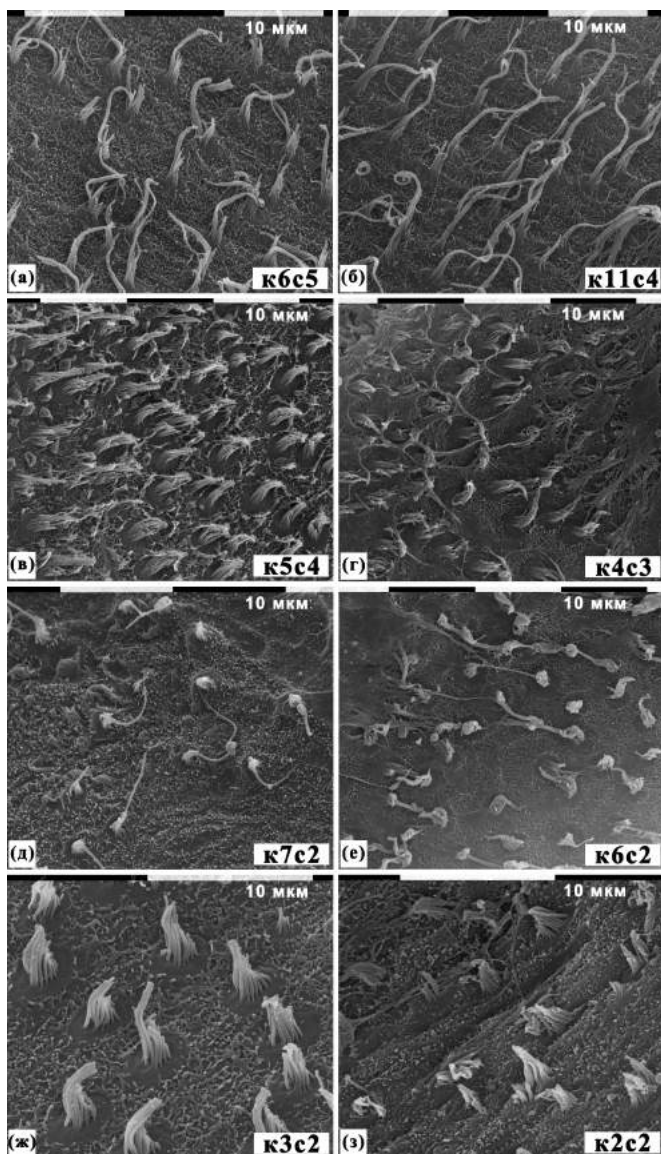


Рисунок 3. Волосковые клетки с разной длиной стереоцилий и киноцилии в саккулярной макуле у сиговых рыб: к6с5 (а), к11с4 (б), к5с4 (в), к4с3 (г), к7с2 (д), к6с2 (е), к3с2 (ж), к2с2 (з), где к – средняя длина киноцилии, мкм; с – средняя длина максимальной стереоцилии, мкм. СЭМ Philips 525M и Quanta 200, FEI Company.

В результате проведенных на гибридах сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ экспериментов показано, что после продолжительной (24 часа) стимуляции интенсивным тональным звуком высокой частоты (3000 Гц, 160 дБ) происходят деструктивные изменения волосковых клеток типов к6с2 и к3с2 (до 60% от общей площади макулы). В частности, зафиксированы локальные повреждения эпителия – разрывы округлой формы диаметром от 0.85 до 5.1 мкм, равные площади апикальной поверхности волосковых клеток, выходящей на поверхность эпителия. Заметно слипание стереоцилий, описанное ранее при повреждении звуком большой интенсивности или ототоксическими антибиотиками у других животных (Gale et al., 2002).

Кроме того, в центральной и периферической зонах на участках с клетками типов к6с2 и к3с2, имеющими более короткие стереоцилии, наблюдалось явление вакуолизации апикальной поверхности этих клеток. Повреждения клеток с удлинёнными стереоцилиями (к5с4, к4с3) в данной серии экспериментов отсутствовали. Предполагается, что изменения клеток типов к6с2 и к3с2 являются результатом их гибели вследствие интенсивной звуковой стимуляции звуками высокой частоты, что подтверждает участие данных клеток в восприятии более высокочастотных звуковых колебаний.

Проведен сравнительный анализ площадей на макулах, занимаемых волосковыми клетками разных типов. Их соотношение (в %) в макуле представлено в таблице 4. Для байкальского омуля характерны большие площади (около 44%), занимаемые клетками с удлинёнными стереоцилиями (4-5 мкм), что способствует наиболее адекватному восприятию пелагическим видом более низкочастотных акустических волн. Подобная тенденция наблюдается и у пелагических голомянок (см. Главу 3). В отличие от пелагических рыб озера Байкал для сига-пыжьяна, типичного обитателя мелководной зоны, свойственны меньшее морфологическое разнообразие и плотность расположения волосковых клеток в макуле (табл. 4). Кроме того, для рецепторного аппарата волосковых клеток сига-пыжьяна, а также ведущего придонный образ жизни байкальского сига типичны короткие стереоцилии (< 3 мкм), воспринимающими более высокочастотные звуковые колебания, которые, судя по всему, легче идентифицируются на фоне низкочастотного шума в мелководной зоне. Сиговые рыбы, благодаря преобладанию клеток с короткими стереоцилиями до 2 мкм (от 56 до 76 % у разных видов, табл. 4), чувствительны к более высокочастотному диапазону, что показано в ходе поведенческих экспериментов по определению диапазонов воспринимаемых ими частот (см. Главу 6). Выявленная закономерность, судя по всему, обусловлена также наличием у сиговых рыб плавательного пузыря, который является хорошим резонатором и способствует трансформации высокочастотных колебаний в легко воспринимаемые тонкой структурой волосковых клеток низкочастотные колебания.

4.2 Особенности дирекционной чувствительности саккулюса

Схемы морфологической поляризации волосковых клеток макул байкальских сиговых рыб отличаются от уже описанной ранее А.Н. Поппером (Popper, 1976) для озерного сига *C. clupeaformis* (рис. 4).

Отмечено сходство в ориентации волосковых клеток макул байкальского сига, сига-пыжьяна и озерного сига *C. clupeaformis*, в частности, для роstralной и центральной зон макул. У байкальского омуля, относящегося к разным МЭГ, схемы морфологической поляризации имели подобное деление на зоны и отличались только процентным соотношением отдельных участков относительно всей площади макул. Выявлено доминирование горизонтальной ориентации волосковых клеток у байкальского омуля пелагической МЭГ и байкальского сига. У байкальского омуля придонно-глубоководной МЭГ вертикальная ориентация несколько превалирует над горизонтальной. Для макулы мелководного сига-пыжьяна характерны как горизонтальная, так и вертикальная ориентация волосковых клеток. У гибридов сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ наблюдается смешанный тип ориентации волосковых клеток.

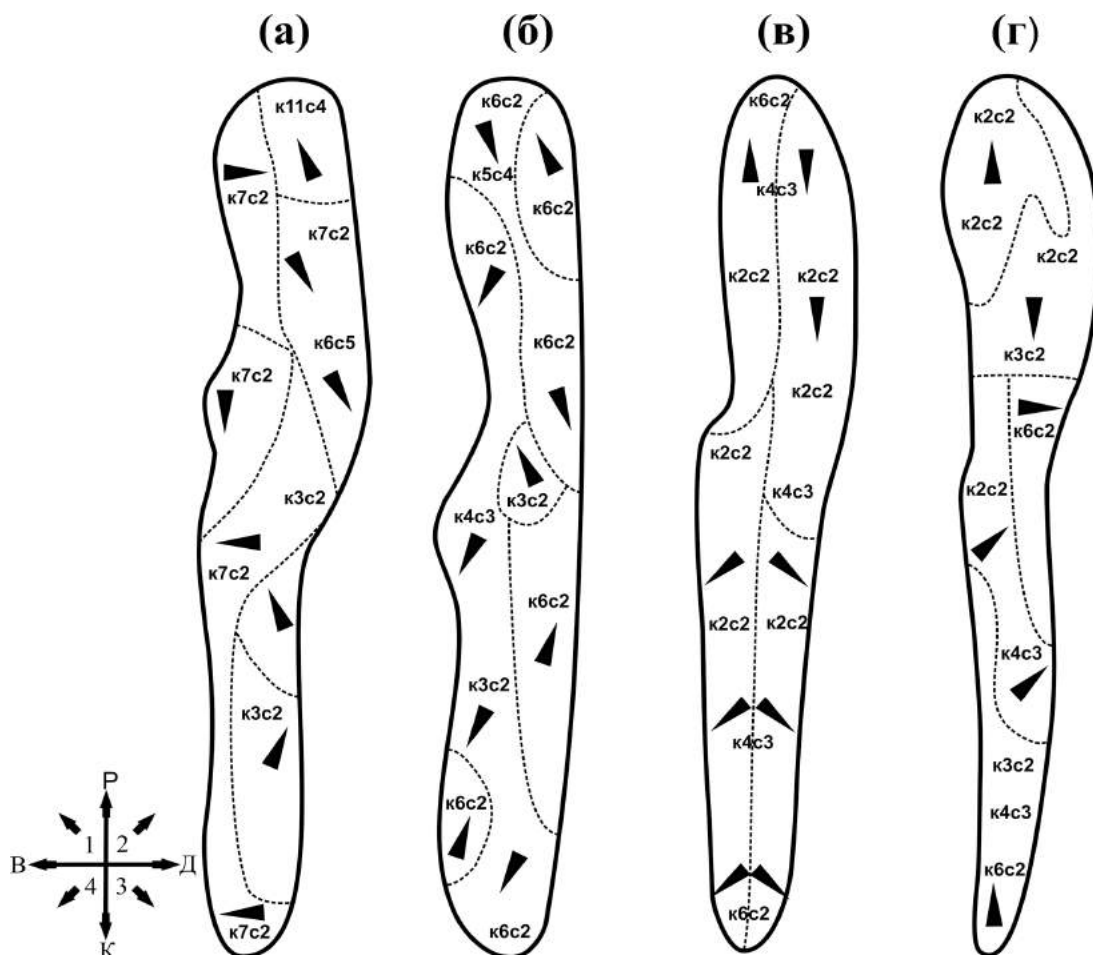


Рисунок 4. Схемы распределения волосковых клеток разного типа в саккулярной макуле и их морфологической поляризации у байкальского омуля (а), гибрида сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ (б), сига-пыжьяна (в), байкальского сига (г). Направления поляризации волосковых клеток: в - вентральное, д - дорсальное, р - ростральное, к - каудальное, 1 - ростровентральное, 2 - ростродорсальное, 3 - каудодорсальное, 4 - каудовентральное. (↓) - вектор поляризации (от стереоцилий к киноцилии). По данным СЭМ Philips 525M и Quanta 200, FEI Company.

На основе соотношения (в %) участков макулы с разной ориентацией волосковых клеток относительно всей макулы построены диаграммы максимальной дирекционной чувствительности саккулюса в сагиттальной плоскости. Диаграмма дирекционной чувствительности саккулюса байкальского омуля является наиболее сложно организованной и имеет значительные проекции как в вертикальной, так и в горизонтальной плоскостях. Байкальский омуль образует быстро мигрирующие стаи, для него характерны активные горизонтальные и вертикальные миграции в пелагиали озера, размножение байкальского омуля также тесно связано с речными системами, а его популяционная структура определяется особенностями ареала размножения и фактором пространственной изоляции (Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009). Оптимальными направлениями для восприятия акустических сигналов саккулюсом сига-пыжьяна являются как горизонтальная, так и вертикальная плоскости, что можно объяснить приуроченностью сига-пыжьяна к мелководной зоне и его обитанием преимущественно в речных системах (Скрябин, 1969). Такого рода пространственная изоляция позволила сигу-пыжьяну сформировать узкоспециализированную слуховую систему, ориентированную на восприятие звука при его постоянной реверберации и многократном отражении от дна в вертикальной плоскости. При сравнении дирекционной чувствительности саккулюса родительских форм с таковыми гибридных форм видно, что по большинству признаков гибриды сига-пыжьяна ♀ и

байкальского омуля ♂ занимают промежуточное положение. Значение гибридизации, в данном случае, способствует увеличению изменчивости сенсорных способностей особей, расширению возможностей в освоении экологических ниш (Шупаков, Харченко, 1954, 1959; Померанцев, Нестеренко, 1960; Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009). Диаграмма дирекционной чувствительности саккулюса байкальского сига значительно варьирует в горизонтальной плоскости, имея достаточно узкую проекцию в вертикальной плоскости, и организована проще по сравнению с диаграммой дирекционной чувствительности саккулюса байкальского омуля. Байкальский сиг ведет менее активный образ жизни по сравнению с байкальским омулем, не совершая активных миграций. Кроме того, озерный сиг в отличие от байкальского омуля и сига-пыжьяна не связан с речными системами и нерестится во внутренних частях заливов Байкала (Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009).

ГЛАВА 5. СТРУКТУРА САККУЛЯРНЫХ ОТОЛИТОВ У БАЙКАЛЬСКИХ РЫБ

5.1 Особенности формирования отолитов на примере рогатковидных рыб разных экологических групп

Кальций содержащие элементы обнаруживаются непосредственно в приядерной зоне цитоплазмы клеток транзитного эпителия в виде отдельных не ограниченных мембраной электронноплотных нитей длиной до 1.0 ± 0.012 мкм, которые объединяются в более крупные округлые агрегаты, перемещаются в апикальные отделы клетки и далее высвобождаются на поверхность клетки в виде отоконий. Адсорбция полиотокониальных образований происходит в местах прироста дополнительной массы, за счет которой у отолита формируются характерные борозды и неровности. Благодаря тому, что отолит нарастает неравномерно относительно первичного центра закладки, сохраняется его видоспецифичная фигурная форма. Предполагается, что сгруппированное расположение отоконий (наличие полиотокониальных масс), а также наличие кристаллизованных (аберрантных) отолитов в саккулярном слуховом аппарате - характерная черта отолитового аппарата донных обитателей прибрежной зоны озера Байкал, в частности, каменной широколобки. Для акустико-гравитационного аппарата пелагических глубоководных видов рыб, в частности, большой голомянки, полиотокониальные массы и аберрантные отолиты нетипичны. Абберрация отолита у каменной широколобки является следствием особо динамичных условий обитания этого вида в литоральной зоне и способствует адаптивному изменению акустико-гравитационной чувствительности для распознавания определенных относительно головы рыбы направлений звука.

5.2 Топография и химический состав саккулярных отолитов

Методом РФЭС показано, что различия между образцами отолитов разных видов рыб состоят в различном содержании натрия, фосфора и азота, концентрации которых варьируют в пределах от долей процента до 10% и более (для фосфора) в зависимости от природы образца. В образцах отолитов северобайкальской желтокрылки и каменной широколобки по сравнению с байкальским омулем количество карбоната кальция при измерении растет медленнее, то есть слой органического вещества толще. Изменение процессов формирования отолита на макро- и микроуровнях приводит к полиморфизму кристаллизации карбоната кальция – образованию таких его модификаций, как ватерит или кальцит, вместо типичного

арагонита (Parmentier et al., 2007). Спектры кальция, углерода, кислорода - как основных компонентов отолитов - проанализированы на измельченных образцах. ЭС Ca 2p_{3/2} образцов находятся в пределах 347.5 ± 0.2 эВ. Для арагонита характерна большая ширина линии кальция, чем для ватерита (для измельченного отолита каменной широколобки ширина на полувысоте линии Ca 2p_{3/2} составляет 1.78 и 1.64 эВ, соответственно), однако, этот критерий едва ли можно считать надежным, поскольку в отолитах содержится смесь полиморфных модификаций карбоната кальция и органическое вещество. Анализ требует подключения микроскопических методов определения модификации карбоната кальция по форме кристаллов. С помощью метода АСМ показаны различия в топографии арагонитовых и ватеритовых отолитов байкальских рыб: арагонитовые отолиты байкальских рыб имеют преимущественно игольчатую топографию, в отличие от аморфных ватеритовых.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА АКУСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАЙКАЛЬСКИХ РЫБ ПРИ ЗВУКОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

В ходе тестовых экспериментов был разработан ряд алгоритмов, позволяющих получить оценку одиночного и стайного поведения байкальских рыб при воздействии на них акустическими сигналами (Куликов, Сапожникова, 2011; Сапожникова и др., 2013). В качестве статистик при количественной оценке поведения стаи особей байкальского омуля были выбраны карта плотности вероятности, показывающая пространственное предпочтение животного (яркость соответствует предпочтению данной области: чем яркость выше, тем больше времени животное провело в данной области), и карта активности с областями, в которых животные имели более высокую подвижность. Карта плотности вероятности вычислялась как сумма бинарных изображений объектов за период наблюдения. Карта активности вычислялась как сумма разностей между двумя последовательными бинарными изображениями за время эксперимента. В ходе эксперимента отмечено значительное увеличение активности и уменьшение плотности особей при звуковом воздействии в отличие от таковых при отсутствии звука. Данная модель фиксации поведения рыб в контроле и в эксперименте позволяет успешно регистрировать реакцию особей на наличие чувствительности к конкретному звуковому сигналу. Описанные методические подходы использовались при оценке акустической чувствительности других видов рогатковидных и сиговых рыб - каменной широколобки, северобайкальской желтокрылки, сига-пыжьяна, байкальского сига, гибридов сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂.

6.1 Регистрация особенностей акустической чувствительности у байкальских рыб

С использованием разработанных алгоритмов и описанной выше методики (см. Главу 2.5) проведены эксперименты по определению частотных диапазонов максимальной акустической чувствительности на одиночных половозрелых особях каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки, а также на одиночных особях и группе особей (5 и 10 экз.) байкальского омуля, сига-пыжьяна, байкальского сига и гибридов сига-пыжьяна и байкальского омуля. Для каменной широколобки это значение составляет 300-700 Гц, для северобайкальской желтокрылки – 300-500 Гц), для байкальского омуля – 400-800 Гц, для сига-пыжьяна – 600-800 Гц, для гибридов баргузинского сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ – 500-800 Гц, для байкальского сига – 600-1500 Гц. На основе результатов трассировки построены

аудиограммы, графики зависимости слуховых порогов от частот, на которых отмечена наибольшая ответная реакция на звуковой сигнал у одиночных особей рогатковидных рыб и группы особей (10 экз.) сиговых рыб, ведущих стайный образ жизни. Отмечено общее сходство аудиограмм рогатковидных и сиговых рыб, что, по-видимому, определяется подобием условий их обитания в одном водоеме. Однако, диапазон максимальной чувствительности у рогатковидных рыб находится в более низкой области частотного диапазона по сравнению с сиговыми рыбами, что, скорее всего, предопределяется морфологией саккулярного аппарата, в частности, наличием у рогатковидных рыб волосковых клеток с высокими стереоцилиями (к13с9, к9с8), а также отсутствием у них плавательного пузыря. Средние пороговые уровни восприятия в максимуме чувствительности у рогатковидных рыб выше, чем у сиговых рыб, и составляют 104 дБ и 93 дБ, соответственно. Повышение слуховых порогов у рогатковидных рыб, вероятно, является адаптацией этих рыб к обитанию в прибрежной зоне озера, где наблюдается сильный шумовой фон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что рогатковидные и сиговые рыбы озера Байкал отличаются высокой пластичностью к действующим акустическим факторам среды обитания, а возникающие при этом адаптации формируются, прежде всего, на ультраструктурном уровне. Диапазоны максимальной акустической чувствительности рогатковидных и сиговых рыб также обусловлены макро- и ультраструктурными особенностями их саккулярного аппарата. В пользу последнего факта свидетельствует то, что на всех зонах макулы с разной поляризацией волосковые клетки имеют стереоцилии и киноцилии разной длины, которая коррелирует с чувствительностью этих клеток. Описанные морфологические различия слухового саккулярного аппарата байкальских рыб могут отражать их специфические особенности как в отношении их частотных параметров, так и в определении направления источника акустических сигналов в воде. Наблюдается корреляция между особенностями морфологической поляризации волосковых клеток, дирекционной чувствительностью саккулюса рогатковидных и сиговых рыб и особенностями акустической среды их обитания.

Выявленное сходство морфологической поляризации волосковых клеток в саккулюсе сиговых рыб природных популяций и полученных в искусственных условиях свидетельствует о том, что данный признак не претерпевает существенных видимых изменений при искусственном выращивании рыб и, по-видимому, закреплен генетически. Подобная картина адаптации сиговых рыб к акустическим параметрам среды обитания может наблюдаться и у симпатрической пары североамериканских сиговых рыб – карликовой и нормальной форм озера Сига *C. clupeaformis* и их гибридов. Очевидно, было бы интересно провести дополнительные исследования по изучению механизмов адаптации сиговых рыб к подобному образу жизни в условиях другого водоема. Приведенные данные о морфологической поляризации волосковых клеток макул у рогатковидных и сиговых рыб и варибельности форм их отолитов, контактирующих с макулой, коррелируют с особенностями условий их обитания и в перспективе могут быть полезны для изучения принципов закладки и дальнейшего адаптивного формирования различных форм отолитов.

Таким образом, саккулярный аппарат слуховой системы рогатковидных и сиговых рыб отличается высокой морфологической специализацией, способствующей эффективному восприятию акустических сигналов. Данные результаты позволяют предположить, что акустическая сигнализация может играть заметную роль в регуляции их поведения. Благодаря возрастающей доступности новых методов ультраструктурного анализа сенсорных систем, виды рыб, изучаемые в экологическом контексте их среды обитания, могут выступать в роли адекватных моделей при выявлении причинно-следственных связей между структурой и функциональными возможностями организма. В теоретическом плане полученные данные позволят лучше понять эволюционные закономерности формирования сенсорных систем и поведенческих адаптаций рыб в уникальных природных условиях.

ВЫВОДЫ

1. У рогатковидных и сиговых рыб озера Байкал выявлены разные морфотипы волосковых саккулярных клеток. Для обитателей мелководной зоны в слуховом эпителии характерно наличие клеток с преимущественно короткими стереоцилиями ($k1lс1$, $k9с2$ – у рогатковидных; $k2с2$, $k3с2$, $k6с2$, $k7с2$ – у сиговых), воспринимающими более высокочастотные звуковые колебания, которые легче идентифицируются на фоне низкочастотного шума в прибрежной зоне. Для пелагических видов характерны большие площади макулы, занимаемые волосковыми клетками с удлинёнными стереоцилиями ($k9с8$ – у рогатковидных; $k6с5$ – у сиговых), что вероятно, способствует восприятию низкочастотных акустических волн.

2. У прибрежного бентического вида – каменной широколобки – и у бентопелагического вида – северобайкальской желтокрылки – выявлено доминирование вертикальной морфологической поляризации волосковых клеток. В отличие от этого, на саккулярной макуле сиговых рыб и голомянок горизонтальная ориентация волосковых клеток превалирует над вертикальной. Предполагается, что дирекционная чувствительность саккулюса у рогатковидных и сиговых рыб обусловлена особенностями морфологической поляризации волосковых клеток и предопределяет особенности их акустического поведения.

3. Микрорельеф и размер отдельных отоконий отолита предопределяют диапазон и особенности дирекционной слуховой чувствительности у разных видов рыб, что, в свою очередь, отражается на поведенческой активности этих рыб в различных условиях окружающей звуковой среды.

4. У рогатковидных беспузырных рыб максимальная акустическая чувствительность находится в более низкочастотном диапазоне (каменная широколобка – 300–700 Гц, северобайкальская желтокрылка – 300–500 Гц) по сравнению с пузырными сиговыми рыбами (байкальский омуль – 400–800 Гц, гибриды сига-пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ – 500–800 Гц, сиг-пыжьян – 600–800 Гц, байкальский сиг – 600–1500 Гц), что, судя по всему, предопределяется морфологией саккулярного аппарата, в частности, наличием у рогатковидных рыб волосковых клеток с более высокими стереоцилиями ($k13с9$, $k9с8$), а также отсутствием у них плавательного пузыря.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Сапожникова Ю.П., Клименков И.В., Ханаев И.В. Особенности макро- и ультраструктур сенсорного слухового аппарата *Cottoidei* озера Байкал // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2003. – Т. 7. – С. 138-140.
2. Сапожникова Ю.П., Клименков И.В., Мельник Н.Г. Особенности морфологической поляризации сенсорных элементов слухового саккулярного эпителия у байкальских рогатковидных рыб (*Cottoidei*) // Сенсорные системы. – 2007. – Т. 21. – №2. – С. 140-146.
3. Сапожникова Ю.П., Клименков И.В., Ермакова А.О., Шидловский Л.М., Гершевский П.Г., Томас А.Р. Исследование сенсорной слуховой системы байкальских рогатковидных рыб (*Cottoidei*) методами электронной микроскопии // Известия ИГУ. Серия «Биология. Экология». – 2008. – Т. 1. – № 2. – С. 37-40.
4. Сапожникова Ю.П., Клименков И.В., Ханаев И.В. Особенности формирования отолитов у некоторых рогатковидных рыб разных экологических групп озера Байкал // Сенсорные системы. – 2010. – Т. 24. – № 1. – С. 73-86.
5. Глызина О.Ю., Глызин А.В., Суханова Л.В., Белых О.И., Тягун М.Л., Сапожникова Ю.П., Зайцева А.Н., Куликов В.А., Дзюба Е.В. Холодноводный пресноводный аквариумный комплекс как основа для научных исследований // Вода: химия и экология. – 2012. – Т. 12. – С. 80-88.
6. Sapozhnikova Yu.P., Klimenkov I.V., Khanaev I.V., Makarov M.M., Belous A.A. Ultrastructure of saccular epithelium sensory cells of four sculpin fish species (*Cottoidei*) of Lake Baikal in relation to their way of life // Journal of Ichthyology. – 2016. – Vol. 56. – № 2. – P. 289–297.

Прочие публикации

7. Сапожникова Ю.П., Ханаев И.В., Тьков А.В., Мельник Н.Г. Особенности слухового саккулярного аппарата каменной широколобки *Paracottus knerii* как типичного донного обитателя литоральной зоны озера Байкал // Четвертая Верещагинская Байкальская конференция. Тезисы докладов и стендовых сообщений. – Иркутск, 2005. – С. 170-171.
8. Sapozhnikova Yu.P., Klimenkov I.A., Khanaev I.V., Melnik N.G. Peculiarities of Sensory Organs of Baikal Endemics – Golomyankas (Comephoridae). // Book of abstracts. An International Scientific Conference «Aquatic Ecology at the Dawn of XXI Century». – St. Petersburg: Zoological Institute, 2005. – P. 82.
9. Сапожникова Ю.П., Смирнова О.Г., Клименков И.В. Сенсорные системы байкальских эндемичных рыб рода *Comephorus* // IX Съезд Гидробиологического общества РАН. – Тольятти, 2006. – С. 140.
10. Sapozhnikova Yu., Klimenkov I., Melnik N. Peculiarities of morphological polarization of sensor elements of yearling saccular epithelium in Baikal *Cottoidei* // Materials of III International Young Scientists conference Biodiversity. Ecology. Adaptation Evolution. – Odesa, 2007. – P. 133.
11. Сапожникова Ю.П., Клименков И.В., Мельник Н.Г. Рост отолита байкальских рогатковидных рыб (*Cottoidei*) в связи с развитием сенсорного слухового эпителия // Молодежь и наука Забайкалья: Материалы научной конференции. – Чита: Изд-во ЗабГГПУ, 2008. – С. 97-99.

12. **Сапожникова Ю.П.** Особенности биоминерализации отолитов на примере рогатковидных рыб разных экологических групп озера Байкал. // X Съезд Гидробиологического общества при РАН. – Владивосток, 2009. – С. 353.
13. Михлин Ю.Л., Романченко А.С., **Сапожникова Ю.П.** РФЭС и АСМ изучение отолитов рыб озера Байкал // XX Всероссийская научная конференция. «Рентгеновская спектроскопия и химическая связь РЭСХС-2010». – Новосибирск: Институт катализа СО РАН, 2010. – С. 122.
14. Куликов В.А., **Сапожникова Ю.П.** Алгоритм оценки параметров пересекающихся объектов на бинарном изображении // Всероссийской конференции «Математическое моделирование и вычислительно-информационные технологии в междисциплинарных научных исследованиях». – Иркутск, 2011. – С. 80–82.
15. **Sapozhnikova Yu.P.**, Belous A.A., Glyzina O.Yu., Sukhanova L.V., Klimenkov I.V. Auditory sensibility and acoustic behaviour of whitefish (Coregonidae) in Lake Baikal // Abstracts VI Russian congress of young biologists «SymBioS Russia 2013» with international participation. – Irkutsk: Asprint, 2013. – P. 371-374.
16. **Сапожникова Ю.П.**, Луликов В.А., Кирильчик С.В., Смолин И.Н., Небесных И.А. Алгоритм оценки поведения и акустической чувствительности байкальского омуля в условиях эксперимента // Омuleвая колыбель. Большереченскому рыбноводному заводу – 80 лет. – 2013. – С. 76-88.
17. Куликов В.А., **Сапожникова Ю.П.**, Кирильчик С.В., Суханова Л.В., Глызина О.Ю., Яхненко В.М. Алгоритмы количественного анализа поведения байкальского омуля в условиях эксперимента // Материалы докладов V Всероссийской конференции «Поведение рыб». – Борок: Издательство «Костромской печатный дом», 2014. – С. 131-136.
18. **Сапожникова Ю.П.**, Белоус А.А., Клименков И.В., Куликов В.А., Суханова Л.В., Глызина О.Ю., Яхненко В.М. Акустическая чувствительность байкальского омуля // Материалы докладов V Всероссийской конференции «Поведение рыб». – Борок: Издательство «Костромской печатный дом», 2014. – С. 244-249.
19. Belous A.A., **Sapozhnikova Yu.P.**, Sukhanova L.V., Glyzina O.Yu. Morphological and functional research of sensory auditory epithelium of whitefish of Lake Baikal // Abstracts 12th International symposium on the biology and management of Coregonid fishes. – Irkutsk: Asprint, 2014. – P. 20.
20. **Sapozhnikova Yu.P.**, Belous A.A., Klimenkov I.V., Sukhanova L.V., Glyzina O.Yu. Algorithm for estimating the acoustical sensitivity of whitefish of Lake Baikal // Abstracts 12th International symposium on the biology and management of Coregonid fishes. – Irkutsk: Asprint, 2014. – P. 64.