

На правах рукописи

Борисов Василий Борисович

РОЛЬ ГЕТЕРОХРОНИЙ РАННЕГО КРАНИОГЕНЕЗА В
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ ПУЧКА ВИДОВ БОЛЬШИХ
АФРИКАНСКИХ УСАЧЕЙ *LABEOBARBUS* (TELEOSTEI; CYPRINIDAE)
ОЗЕРА ТАНА (ЭФИОПИЯ)

03.02.04 – зоология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории Проблем эволюционной морфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,

Смирнов Сергей Васильевич

Ведущий научный сотрудник лаборатории Проблем эволюционной морфологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,

Голубцов Александр Серафимович

Ведущий научный сотрудник лаборатории Экологии низших позвоночных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН»

Доктор биологических наук,

Дзержинский Феликс Янович

Профессор кафедры Зоологии позвоночных Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится 12 ноября 2013 года в 14:00 на заседании Диссертационного совета Д 002.213.01 при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33.

Тел./факс: 8(495)9523584, sevin.ru, email: zashita@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ОБН РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33.

Автореферат разослан 11 октября 2013 года.

Учёный секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук

Е.А. Кацман

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Большие гексаплоидные африканские усачи комплекса *Labeobarbus* (= *Barbus*) *intermedius* sensu Banister, 1973 (Teleostei; Cyprinidae), эндемики озера Тана (Эфиопия), образуют крупнейший из ныне существующих пучок видов карповых рыб. Он состоит из 15 близкородственных симпатрических видов, имеет предположительно монофилетическое происхождение от *L. intermedius* (или сходной с ним иной предковой формы) – фенотипически полиморфного вида, широко распространённого в водоёмах Восточной Африки (De Graaf et al., 2010). Возраст пучка не превышает 15 тысяч лет.

Большие танские усачи демонстрируют высокий уровень морфологического разнообразия, значительно различаясь между собой по пропорциям головы и тела, положению рта, относительным размерам глаз и пластическим признакам головы (Sibbing, Nagelkerke, 2001). Кроме того, танские *Labeobarbus* различаются и по экологии – 8 из 15 видов адаптированы к хищному образу жизни (De Graaf et al., 2008).

Морфология и экология танских усачей интенсивно исследовалась в последние десятилетия (Sibbing et al., 1998; Dgebuadze et al., 1999; Nagelkerke, Sibbing, 2000; De Graaf et al., 2008). Особенный интерес танский пучок видов представляет для эволюционной биологии – его часто называют «природной лабораторией» для изучения процессов адаптивной радиации и видообразования (Sibbing et al., 1998).

Относительно небольшой возраст пучка танских *Labeobarbus* и отсутствие выраженных генетических различий между его видами (Berrebi, Valiushok, 1998; De Graaf et al., 2010) указывают на то, что адаптивная радиация и морфологическая дивергенция представляли собой стремительный эволюционный процесс. Предполагается, что наиболее вероятным механизмом их морфологической дивергенции являются гетерохронии (Mina et al., 2001) – изменения времени и темпов онтогенетических процессов, приводящие к изменениям в дефинитивной морфологии. Гетерохронии считаются важным эволюционным механизмом (Шмальгаузен, 1938; De Beer, 1958; Gould, 1977; Alberch, Alberch, 1981), так как небольшие генетические изменения, вызывающие относительные сдвиги во временных параметрах онтогенеза, могут приводить к скоординированным изменениям в морфологии, физиологии и поведении животных (Gould, 1977). Роль гетерохроний в эволюционных преобразованиях была установлена для многих групп и линий рыб (Емельянов, 1977; Balon, 1979; Meyer, 1987; Alekseev, 1994; Воскобойникова, 2001; Пичугин, 2009; Пичугин, Чеботарёва, 2011 и др.).

Предположение о роли гетерохроний в морфологической дивергенции танских усачей основывается на наблюдаемых изменениях пропорций костей черепа в позднем онтогенезе (Mina et al., 1996), при этом признаётся, что более полное представление о дивергенции может дать исследование раннего онтогенеза, «начиная со времени формирования черепа» (Мина, 2000, стр. 475). Однако ранний краиногенез танских *Labeobarbus* остаётся совершенно неисследованным, хотя именно такие параметры морфогенеза черепа как время и последовательность появления скелетных элементов, будучи видоспецифическими, могут являться «инструментами» филогенетического анализа и эволюционных реконструкций (Strauss, 1990; Mabee et al., 2000).

Согласно гипотезе, предложенной М.В. Миной и Ю.Ю. Дгебуадзе, гетерохронии, ответственные за возникновение морфологических различий у танских усачей, вероятно, являются следствием изменений в системе гормональной регуляции развития (Mina, Dgebuadze, 2008). Известно, что в гормональной регуляции онтогенеза костистых рыб ведущую роль играют гормоны щитовидной железы (тиреоидные гормоны/ТГ), индуцирующие многие онтогенетические процессы и влияющие на их скорость, сроки и продолжительность (Janz, 2000). Показано, что ТГ принимают участие в регуляции метаморфных преобразований черепа у камбал (Okada et al., 2003), но в целом роль ТГ в краиногенезе рыб остаётся малоизученной. Неизвестна она и для танских усачей, хотя именно изменения в тиреоидной системе регуляции, согласно гипотезе С. Крокфорд, сыграли ключевую роль в формировании многих озёрных пучков видов рыб (Crockford, 2002; 2004).

Цель и задачи исследования

Цель работы – изучение роли гетерохроний раннего краиногенеза в процессах морфологической диверсификации пучка видов *Labeobarbus* озера Тана. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести детальное изучение нормального развития хрящевого и костного черепа трёх видов усачей: *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma*.
2. Сравнить последовательность и время появления хрящей и костей черепа в онтогенезе трёх исследованных видов. В случае выявления гетерохроний развития данных структур, проанализировать их вероятную роль в процессах дивергенции краинальной морфологии.
3. Изучить влияние ТГ на сроки и последовательность появления скелетных элементов черепа и дефинитивную морфологию *L. intermedius*.

4. Сопоставить онтогенетические процессы ТГ-индуцированного краиногенеза предположительно анцестрального вида *L. intermedius* с онтогенетическими процессами нормального краиногенеза *L. brevicephalus* и *L. megastoma*.

5. На основании полученных результатов и литературных данных проанализировать гипотезу о роли вероятных изменений тиреоидной физиологии в качестве триггера эволюционно значимых изменений краиногенеза больших усачей озера Тана.

Научная новизна

Впервые подробно описано нормальное развитие черепа *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma*, начиная с образования первых хрящевых элементов и заканчивая появлением наиболее поздних костей.

Установлено, что процессы хондрокраиногенеза являются высоко консервативными, практически не различающимися у трёх исследованных видов. Процессы остеокраиногенеза являются менее консервативными: хотя последовательность появления костей у исследованных видов остаётся сходной, динамика появления костей значительно отличается.

Обнаружена хронологическая диссоциация процессов хондрогенеза и остеогенеза черепа: развитие костного черепа *L. brevicephalus* ускорено относительно развития собственного хрящевого черепа. В то же время развитие костного черепа *L. megastoma* замедлено относительно развития собственного хрящевого черепа. Кроме того, процессы развития остеокраинума у *L. brevicephalus* ускорены, а у *L. megastoma* замедлены по отношению к процессам развития костного черепа анцестрального вида *L. intermedius*.

Впервые изучена роль тиреоидных гормонов в регуляции раннего краиногенеза Cyprinidae; обнаружено, что повышенный уровень ТГ ускоряет темпы остеогенеза, не влияя на темпы хондрогенеза черепа. Экспериментально показана различная ТГ-реактивность костей.

Показано, что количество костей в черепе Cyprinidae и их форма могут изменяться в зависимости от уровня ТГ, что может в свою очередь приводить к изменению формы и пропорций всего черепа – важных видоспецифических признаков танских *Labeobarbus*.

Теоретическое и практическое значение

Результаты работы имеют значение для понимания роли эволюционно значимых преобразований раннего онтогенеза в качестве вероятных механизмов взрывной морфологической радиации, приводящей, в том числе, к возникновению пучков видов

костистых рыб. Кроме того, результаты работы могут иметь значение для понимания роли гормональных механизмов в регуляции процессов скелетогенеза костистых рыб. Полученные данные могут быть использованы при подготовке лекционных курсов и пособий по биологии развития, общей и эволюционной биологии. Результаты исследования раннего онтогенеза черепа *Labeobarbus intermedius* могут быть использованы в работе по программам сохранения и восстановления численности эндемичных представителей танского пучка видов больших усачей на фоне усиливающихся негативных антропогенных воздействий.

Положения, выносимые на защиту

1. Динамика развития костного черепа *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma* является видоспецифичной. Развитие костного черепа ускорено по сравнению с анцестральным видом *L. intermedius* у *L. brevicephalus* и замедлено у *L. megastoma*.
2. При консервативном характере протекания хондрокраниогенеза гетерохронии процессов остеокраниогенеза приводят к частичной временной диссоциации между ними – в результате одни и те же кости черепа у трёх исследованных видов усачей появляются, растут и дифференцируются в условиях различного пространственного окружения, что может приводить к различиям в их дефинитивной форме и размерах.
3. Уровень тиреоидных гормонов оказывает существенное влияние на хронологию процессов остеокраниогенеза *L. intermedius* и морфологию отдельных костей, практически не влияя на развитие хрящей. Различные кости по-разному реагируют на ТГ.
4. Процессы краниогенеза *L. intermedius* при гипертиреоидизме характеризуются гетерохрониями и демонстрируют заметное сходство с процессами нормального краниогенеза *L. brevicephalus*.

Апробация работы

Материалы исследований были представлены на VIII Международной конференции по раннему онтогенезу рыб и промысловых беспозвоночных (Светлогорск, 2010), на Международной конференции «Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology» (Portugal, Tavira, 2011), на Международной конференции «XIV European Congress of Ichthyology» (Belgium, Liege, 2012), на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2011» (Москва, 2011) и «Ломоносов–2012» (Москва, 2012), на конференциях молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН «Актуальные проблемы

экологии и эволюции в исследованиях молодых учёных» (Москва, 2010; 2012) и на заседании морфологического семинара ИПЭЭ РАН (2012).

Публикации

По теме работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, из них 4 на английском языке.

Структура и объём работы

Диссертация общим объёмом 209 страниц состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка цитированной литературы, включающего 212 работ, из которых 171 на иностранном языке, и приложения. Иллюстративный материал включает 31 рисунок и 8 таблиц.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю С.В. Смирнову и Ф.Н. Шкилю за всестороннюю помощь при выполнении данной работы, Н.Н. Иорданскому, Д.В. Капитановой, К.М. Меркуловой, А.Б. Савинецкому, М.В. Холодовой, О.Ф. Черновой и М.И. Шатуновскому за внимательное ознакомление с моей работой, ценные советы, замечания и рекомендации. Искренняя признательность А.А. Даркову и К.Ф. Дзержинскому, а также сотрудникам Амхарского Регионального Сельскохозяйственного Исследовательского Института Белаю Абдиссе и Вондею Зелалему за помощь в совместных экспедиционных исследованиях в Эфиопии.

Настоящее исследование выполнено в рамках работы Совместной Российско-Эфиопской Биологической Экспедиции (координатор – А.А. Дарков) и поддержано грантами РФФИ (10-04-00787а; 11-04-00117а; 13-04-00031а) и Президента РФ (МК-2026.2011.4).

Содержание работы

Глава 1. Обзор литературных данных

Приводится подробная информация по биологии и экологии больших танских усачей *Labeobarbus*: рассматриваются история их изучения, современное таксономическое состояние, некоторые молекулярно-генетические аспекты, высокое морфологическое разнообразие и вероятные пути его становления, аспекты репродуктивной биологии, предполагаемая трофическая и пространственная сегрегация. Приводится информация по причинам и механизмам возникновения пучков видов костистых рыб, их структуре и распространённости в природе. Приводится подробная информация по истории озера Тана, его физико-химическим характеристикам, сезонным изменениям, трофичности и ихтиофауне. Приводятся данные по дефинитивному строению костного черепа изученных видов Cyprinidae, рассматриваются особенности его раннего развития. Освещены результаты изучения возникновения морфологических различий черепа в результате гетерохронных изменений в позднем онтогенезе различных видов танских *Labeobarbus*. Приводится информация об истории изучения гетерохроний, их современной номенклатуре и значении для эволюционных преобразований животных. Приводятся данные по организации тиреоидной оси костистых рыб, биохимии и метаболизму тиреоидных гормонов, включая сведения о роли ТГ в развитии скелетных элементов.

Глава 2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны три представителя пучка видов больших танских усачей: предполагаемый анцестральный вид *L. intermedius*, мелкий раносозревающий планктофаг *L. brevicephalus* и крупный рыбоядный вид *L. megastoma* (Рис. 1). Следует отметить, что видовой статус указанных *Labeobarbus* является дискуссионным вопросом – согласно представлениям некоторых авторов, танский пучок состоит из совокупности небольшого числа реальных видов и группы морфотипов полиморфного вида *L. intermedius* (Mina, Dgebuadze, 2008).

Весь эмбрионально-личиночный материал был получен в результате искусственных скрещиваний диких производителей, проводимых на месте вылова в нерестовых реках – Гумара и Риб в период с 2007 по 2010 годы. Всего было выращено потомство четырёх пар *L. intermedius*, двух пар *L. brevicephalus* и одной пары *L. megastoma*. Личинки и молодь содержались в 100 литровых аквариумах по 350–400 особей в каждом при стандартных

условиях: постоянной аэрации, температуре воды + 24⁰C и естественном световом режиме (Smirnov et al., 2012).

В ходе эксперимента по изучению влияния ТГ на краиногенез *L. intermedius* потомство двух родительских пар выращивалось в условиях искусственного поддержания концентрации Т₃ в воде на уровне 1 нг/мл. Выбор указанной концентрации был достигнут опытным путём, варьируя от 0,1 до 50 нг/мл – при изменении концентрации в сторону увеличения от уровня 1 нг/мл наблюдался резкий рост смертности личинок, в то время как снижение концентрации ниже 1 нг/мл не вызывало визуально регистрируемых индуцированных изменений скелетогенеза. Прочие условия содержания были идентичны таковым предыдущего эксперимента.

В обоих случаях общая смертность, фиксируемая на протяжении всего исследуемого периода онтогенеза, никогда не превышала 10% от числа оплодотворённых икринок.

Зародыши, личинки и молодь ежедневно в количестве 5–10 экземпляров фиксировались в 4% растворе формалина и проходили тотальную дифференциальную окраску ализарином красным (костная ткань) и альцианом синим (хрящевая ткань) с последующим просветлением 1% раствором КОН и 25–100% раствором глицерина без использования сильнокислых сред в соответствии с методикой Walker, Kimmel (2007). Всего было изготовлено приблизительно 250 totally-окрашенных препаратов *L. megastoma*, 500 – *L. brevicephalus* и 1500 – *L. intermedius* (из которых около 350 личинок были выращены в условиях индуцированного гипертиреоидизма). В дальнейшем препараты изучались с помощью бинокуляров Olympus SZx9 и Leica EZ4, проводились их зарисовка и фотосъёмка.

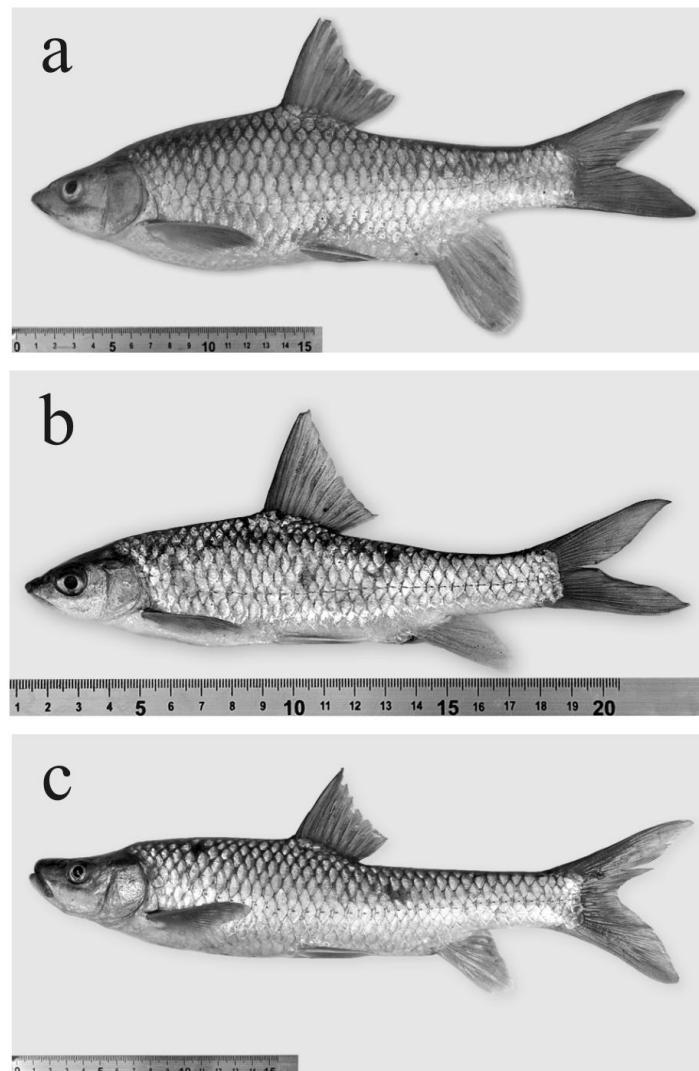


Рис. 1. Внешняя морфология усачей *Labeobarbus* озера Тана. (а) *L. intermedius*; (б) *L. brevicephalus*; (в) *L. megastoma*.

Сроки и последовательность появления хрящей и костей черепа оценивались по времени их массового появления (вмп) у особей исследуемой выборки. За время массового появления принимался возраст (в днях после оплодотворения / дпо), начиная с которого определённая структура присутствовала не менее чем у 80% особей в выборке при условии, что в дальнейшем с увеличением возраста этот показатель не уменьшался, а только увеличивался до 100%. Для большинства скелетных элементов были установлены временные интервалы появления (вип) – промежутки времени между первым появлением данной структуры, по крайней мере, у единственной особи и её появлением у всех особей в изучаемой выборке.

При названии костных и хрящевых структур черепа мы следовали терминологии, использованной главным образом в работах Pashine, Marathe (1977), Langille, Hall (1987) и Cubbage, Mabee (1996).

Глава 3. Результаты исследования

Развитие хрящевого черепа *Labeobarbus intermedius* в норме

Первыми элементами развивающегося хондрокраниума *L. intermedius* являются зачатки парных черепных балок (trabeculae cranii) (3 дпо) и парахордалий (parachordalia) (3,5 дпо), последовательно появляющиеся практически сразу после выхода личинок из яйцевых оболочек (Рис. 2). Процессы морфогенеза хрящевого черепа протекают достаточно равномерно – новые структуры появляются практически ежедневно без каких-либо продолжительных перерывов во времени.

Уже к 5 дпо развиваются некоторые структуры ушного (capsula otica pars anterior, crista parotica, commissura basicapsularis anterior) и затылочного (arcus occipitalis) отделов нейрокраниума. Кроме того, появляются основные элементы висцеральных дуг (cartilago Meckeli, palatoquadratum, hyoideum, hyomandibulare, ceratobranchiale 1,2), связанные с обеспечением жизненно важных функций питания и дыхания (Рис. 2). Дальнейшее течение хондрокраниогенеза идёт по пути постепенного роста и дифференцировки структур монолитного нейрокраниума и расчленённого спланхнокраниума. После появления на 16–17 дпо последнего элемента жаберных дуг – pharyngobranchiale 4 (Рис. 2) последующие изменения в хондрокраниуме ограничиваются исключительно редукцией хрящевой ткани.

Индивидуальная изменчивость в сроках и последовательности появления хрящей не наблюдается. Временные интервалы появления всех хрящевых структур не превышают нескольких часов вследствие синхронности их появления у всех особей в выборке.

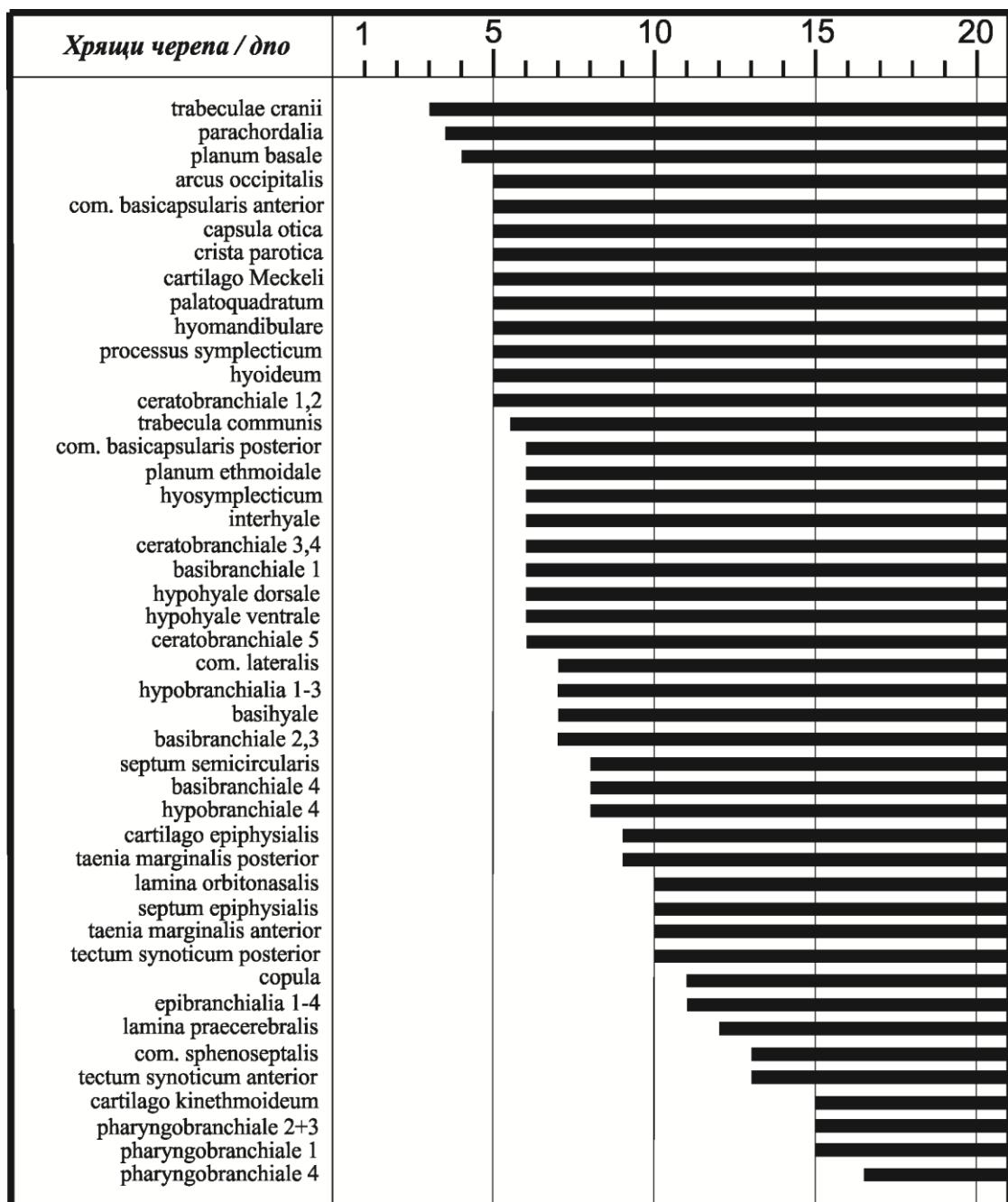


Рис. 2. Общая последовательность и время массового появления хрящей черепа в раннем онтогенезе *L. intermedius*.

Развитие костного черепа *L. intermedius* в норме

Остеокраниогенез *L. intermedius* начинается с появления operculum на 4 дпо и протекает неравномерно: между появлением некоторых костей присутствуют значительные временные интервалы, вследствие чего в нём могут быть выделены устойчивые периоды (Рис. 3).

Первый период (4–11 дпо), обозначенный как «первый пик остеогенеза», характеризуется быстрым появлением 30 различных костей. За ним следует второй период (12–17 дпо),

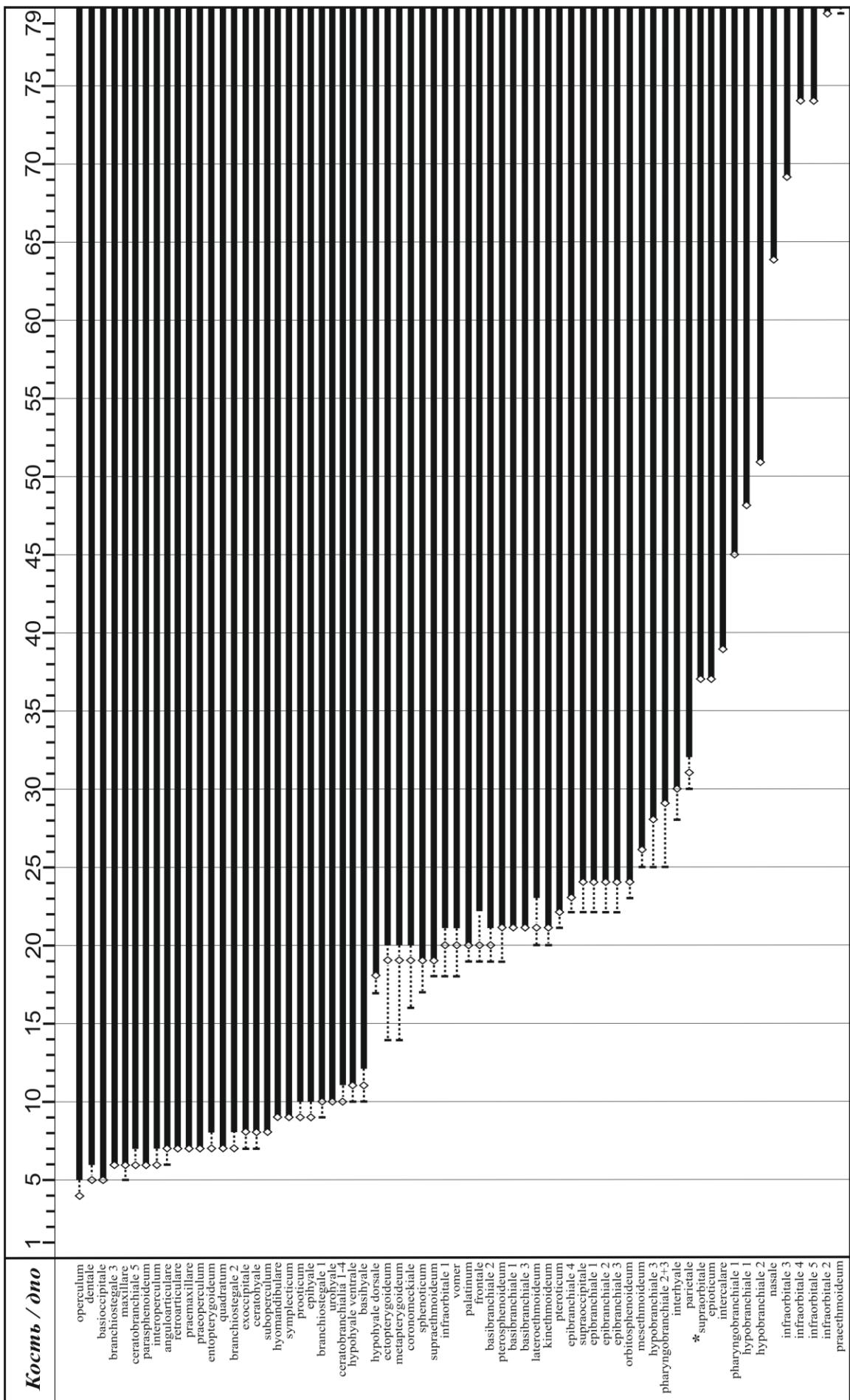


Рис. 3. Общая последовательность и время появления костей в раннем онтогенезе *L. intermedius*. Белый ромб обозначает время массового появления кости, пунктирная линия – временной интервал появления, а сплошная жирная – возраст, при котором определенная кость присутствует у 100% особей. Интервалы появления костей, расположенных под звездочкой (*), не изучены.

обозначенный как «стазис», в течение которого новые кости не появляются, а уже появившиеся растут и подвергаются морфологической дифференцировке. Третий период (18–24 дпо), обозначенный как «второй пик остеогенеза», характеризуется быстрым увеличением числа костей черепа с 30 до 53. Заключительный, четвёртый период остеокраниогенеза длится приблизительно до 85 дпо и характеризуется постепенным увеличением количества костей черепа до дефинитивного набора.

Для всех костей черепа была установлена последовательность появления и время массового появления (Рис. 3). Временные интервалы появления были установлены для большинства костей (Рис. 3).

Развитие черепа *L. brevicephalus*

Развитие хрящевого черепа начинается сразу же после выхода личинок из яйцевых оболочек приблизительно на 3 дпо, протекает достаточно равномерно и завершается к 16–17 дпо. Индивидуальная изменчивость в сроках появления хрящей не наблюдается. Хондрокраниум *L. brevicephalus* не отличается от хондрокраниума *L. intermedius* ни по морфологии хрящевых элементов, ни по их общему количеству. Время и последовательность появления хрящей также представляются крайне сходными у двух указанных видов.

Развитие костного черепа начинается с появления operculum на 4, реже 5 дпо, и протекает довольно равномерно ввиду отсутствия значительных интервалов между временем появления новых окостенений (Рис. 4). Формирование полного набора костей черепа завершается приблизительно к 74–80 дпо.

Временные интервалы появления (вип) были установлены для большинства костей. Вип для operculum, dentale, basioccipitale, branchiostegal 1–3, maxillare, ceratobranchialia 1–5, paraspheonoideum, interoperculum, anguloarticulare, retroarticulare, praemaxillare, praoperulum, entopterygoideum, quadratum, exoccipitale, ceratohyale, hyomandibulare, symplecticum, prooticum, epihyale, hypohyale ventrale, ectopterygoideum, metapterygoideum, supraethmoideum, frontale и pterosphenoideum не превышают одного дня, составляя лишь несколько часов.

Для suboperculum, basihyale, coronomeckiale, sphenoticum, infraorbitale 1, vomer, palatinum, lateroethmoideum, basibranchiale 2 и supraorbitale вип составляет один день. Для urohyale, pteroticum, supraoccipitale, epibranchialia 1–4 и mesethmoideum – 2 дня. Для basibranchiale 1 и 3, kinethmoideum, orbitosphenoideum, interhyale и parietale – 3 дня.

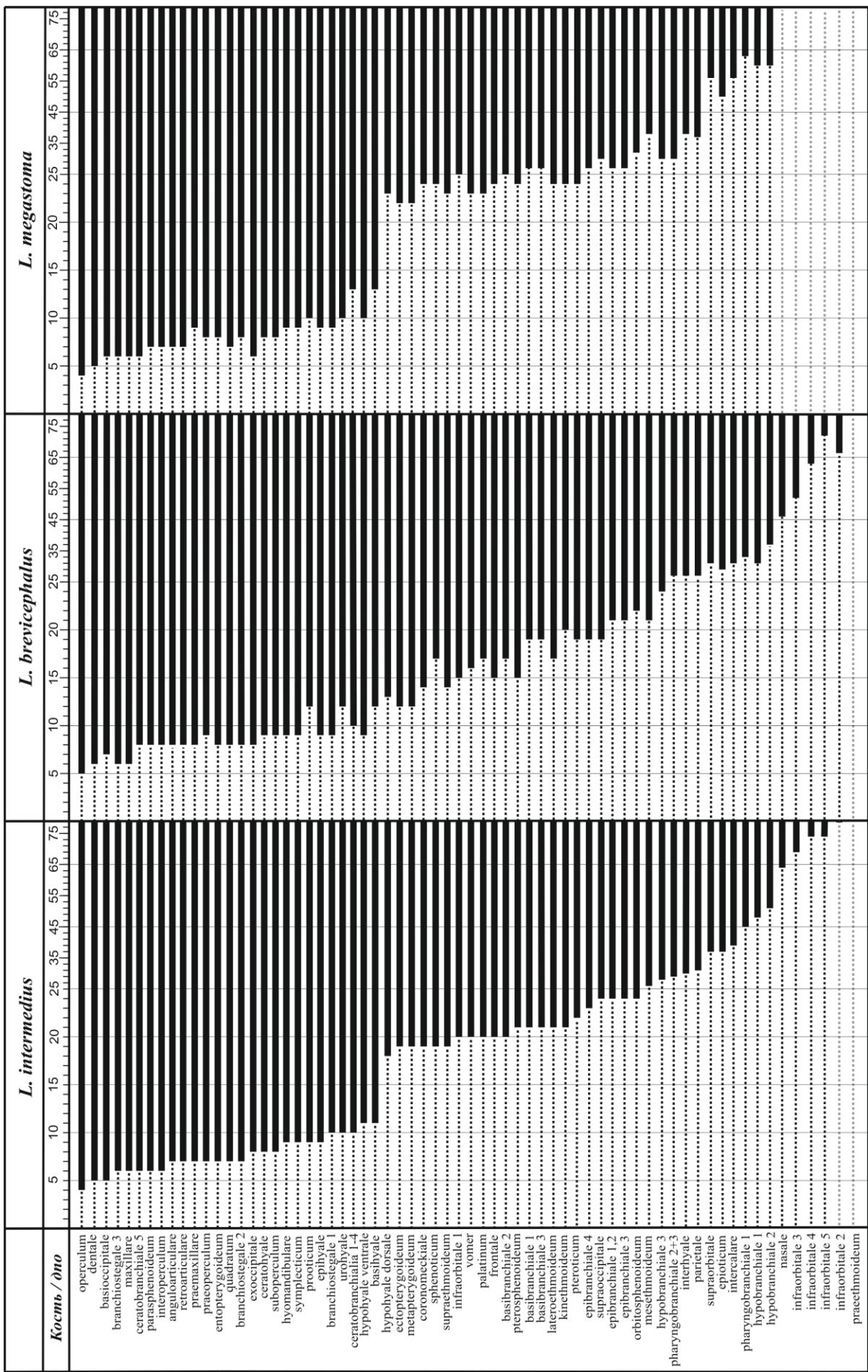


Рис. 4. Общая последовательность и время массового появления костей черепа в раннем онтогенезе *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma*.

Развитие черепа *L. megastoma*

Развитие хрящевого черепа начинается сразу же после выхода личинок из яйцевых оболочек приблизительно на 3 дпо и протекает достаточно равномерно, приводя к формированию дефинитивного набора хрящей к 16–17 дпо. Индивидуальная изменчивость в сроках появления хрящей не наблюдается. Хондрокраниум *L. megastoma* не отличается от хондрокраниума как *L. intermedius*, так и *L. brevicephalus* по морфологии, общему количеству хрящевых элементов и хронологии их появления.

Развитие костного черепа начинается с появления operculum на 4, реже 5 дпо. Как и в случае с *L. intermedius*, остеокраниогенез протекает неравномерно и может быть разделён на четыре периода. Первый пик остеогенеза длится с 4 до 13 дпо, период стазиса – с 14 до 22 дпо, а второй пик остеогенеза – с 23 до 27 дпо. Заключительный период остеогенеза является очень продолжительным – к 80 дпо все еще отсутствуют nasale, praethmoideum и infraorbitale 2,4,5 (Рис. 4).

Временные интервалы появления были установлены для большинства костей *L. megastoma*. Вип ceratobranchialia 5, suboperculum, prooticum и supraethmoideum не превышают одного дня, насчитывая лишь несколько часов. Для operculum, dentale, basioccipitale, branchiostegalia 1–3, maxillare, parasphenoideum, interoperculum, anguloarticulare, retroarticulare, praemaxillare, praeoperculum, entopterygoideum, quadratum, exoccipitale, ceratohyale, hyomandibulare, symplecticum, epihyale, urohyale, hypohyale ventrale, hypohyale dorsale sphenoticum, palatinum, basibranchialia 1–3, pterosphenoideum, kinethmoideum, pteroticum и epibranchialia 1–4 вип составляют один день. Для ceratobranchiale 1–4, vomer и orbitosphenoideum – 2, для basihyale и coronomeckiale – 3, для infraorbitale 1, lateroethmoideum и supraoccipitale – 4 и для ectopterygoideum и metapterygoideum – 6 дней.

Развитие черепа *L. intermedius* при повышенной концентрации ТГ

Повышение концентрации ТГ влияет на процессы хондрогенеза черепа *L. intermedius* лишь в незначительной степени. Время и последовательность появления хрящей, а также их морфология практически не изменяются по сравнению с установленной нормой.

Единственной зафиксированной реакцией на повышение уровня ТГ является полная редукция cartilago kinethmoideum и, соответственно, kinethmoideum у примерно 60% исследованных особей. Кроме того, при гипертиреоидизме такие хрящевые структуры как lamina orbitonasalis, processus prerygoideus, palatoquadratum и capsula otica претерпевают

ускоренную редукцию вследствие изменения сроков и темпов развития некоторых замещающих костей, развивающихся на месте указанных хрящей.

Повышение концентрации ТГ оказывает значительное влияние на процессы остеокраниогенеза. Практически для всех костей была отмечена усиленная кальцинация. Такие кости как operculum, dentale, parasphenoideum и branchiostegalia 1–3 демонстрировали заметно ускоренный линейный рост. Некоторые кости изменяли время появления на более раннее, что приводило к изменениям общей динамики краниогенеза и последовательности появления костей черепа по сравнению с нормой. Так, в норме *infraorbitale* 1 и *lateroethmoideum* появляются после *coronomeckiale*, которая, в свою очередь, возникает значительно позднее *basihyale* – одной из последних костей первого пика остеогенеза. Под воздействием повышенной концентрации ТГ последовательность их появления иная: *infraorbitale* 1 / *lateroethmoideum* → *basihyale* / *coronomeckiale* (Рис. 5). Для ряда костей было отмечено существенное сокращение временных интервалов появления. Так, вип для *coronomeckiale* сокращался с 8 дней до одного, для *metapterygoidaeum* – с 8 дней до всего лишь нескольких часов, для *supraethmoideum* – с 3 дней до нескольких часов, для *palatinum* – с 4 до 2 дней (Рис. 5). Кроме того, у приблизительно 50% особей, выращенных в условиях искусственного гипертиреоидизма, количество *infraorbitalia* было уменьшено до четырёх или, значительно реже, трёх.

Глава 4. Обсуждение

Нами не было обнаружено каких-либо различий ни в морфологии, ни во временных параметрах развития хондрокраниума у трёх исследованных видов *Labeobarbus*. Более того, несмотря на ряд незначительных отличий, процессы хондрокраниогенеза изученных *Labeobarbus* характеризуются значительным сходством с таковыми процессами у *Cyprinus carpio* (Pashine, Marathe, 1977), *Barbus barbus* (Vandewalle et al., 1992) и *Danio rerio* (Cubbage, Mabee, 1996) – представителей трёх различных родов семейства Cyprinidae. Таким образом, строение хрящевого черепа и процессы морфогенеза составляющих его структур, вероятно, являются высоко консервативными и в рамках семейства Cyprinidae.

Сопоставление параметров остеокраниогенеза *L. intermedius* и упомянутых выше видов карповых рыб выявляет существенные различия, как во времени, так и в последовательности появления костей, традиционно рассматриваемой в качестве видоспецифического признака, используемого в филогении (Strauss, 1990; Cubbage, Mabee, 1996; Hall, 2005).

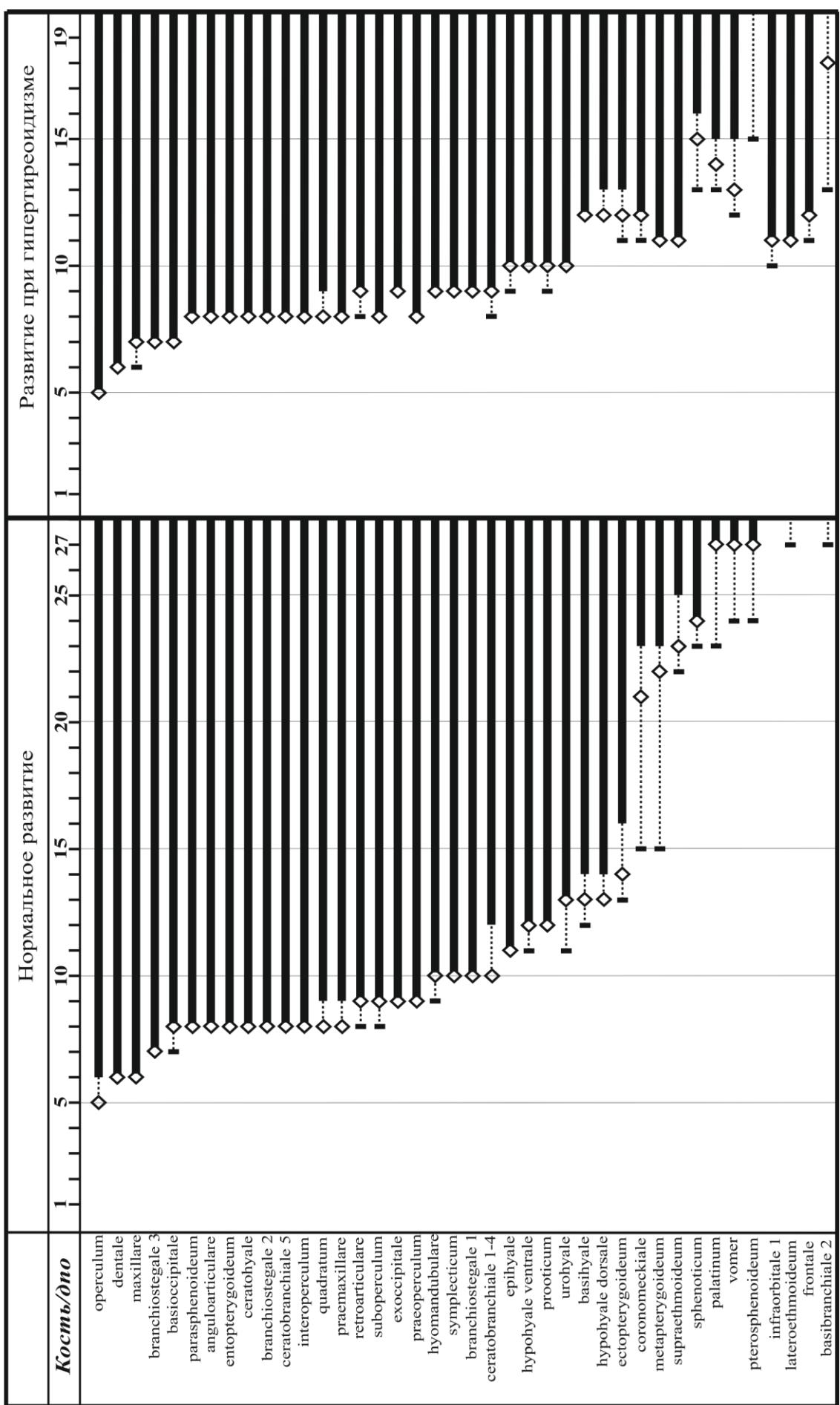


Рис. 5. Общая последовательность и время появления костей черепа в раннем онтогенезе *L. intermedius* при нормальном развитии и в условиях гипертиреоидизма. Белый ромб обозначает время массового появления кости, пунктирная линия – временной интервал появления, а сплошная жирная – возраст, при котором определенная кость присутствует у 100% особей.

Сравнительный анализ хронологии остеокраниогенеза трёх видов *Labeobarbus* показывает, что последние характеризуются высоким сходством последовательности появления костей черепа (Рис. 4). Некоторые различия наблюдаются лишь при сравнении общей последовательности, в то время как последовательности появления костей в каждом из выделенных отделов нейрокраниума (затылочного, ушного, глазничного и обонятельного) и спланхнокраниума (челюстная, подъязычная и жаберные дуги, жаберная крышка) практически совпадают.

В то же время данные усачи демонстрируют устойчивые видоспецифические различия в динамике появления костей черепа (Рис. 4, 6). На ранних этапах онтогенеза они характеризуются практически идентичным состоянием остеокраниума при сходных темпах увеличения длин тела и черепа. Однако, после наступления 11–13 дпо в динамике остеокраниогенеза начинают проявляться значительные различия. У *L. intermedius* и *L. megastoma* наступает период стазиса, и новые кости не появляются, в то время как у *L. brevicephalus* их количество продолжает увеличиваться. В результате на 13 дпо у *L. brevicephalus* остеокраниум представлен 33 костями, а у *L. intermedius* и *L. megastoma* – 30. На 15 дпо остеокраниум *L. brevicephalus* представлен уже 38 костями, в то время как в остеокраниуме *L. intermedius* и *L. megastoma*, находящихся в периоде стазиса, по-прежнему насчитывается только 30 костей. Максимальное различие между *L. brevicephalus*, *L. intermedius* и *L. megastoma* наблюдается на 21 дпо, когда их остеокраниум насчитывает соответственно 53, 46 и 30 костей.

По сравнению с остеокраниогенезом *L. intermedius*, предположительно являющегося для остальных танских усачей анцестральным (или близким к таковому) видом, развитие костного черепа ускорено у *L. brevicephalus* и замедлено – у *L. megastoma* (Рис. 6). Кроме того, процессы остеокраниогенеза *L. brevicephalus* и *L. megastoma* являются соответственно ускоренными и замедленными относительно эволюционно консервативных процессов собственного хондрокраниогенеза.

Из-за различий в динамике остеокраниогенеза одноименные кости черепа у трёх видов усачей появляются, растут и дифференцируются в условиях различного пространственного окружения из соседних костных и хрящевых структур. У *L. megastoma*, вследствие пролонгированного периода стазиса, кости второго пика остеогенеза появляются в несколько ином по сравнению с анцестральным видом окружении – некоторые хрящи и кости первого пика остеогенеза успевают разрастись сильнее и занимают большую территорию. Противоположная ситуация имеет место в морфогенезе черепа *L. brevicephalus*, не имеющего выраженного периода стазиса.

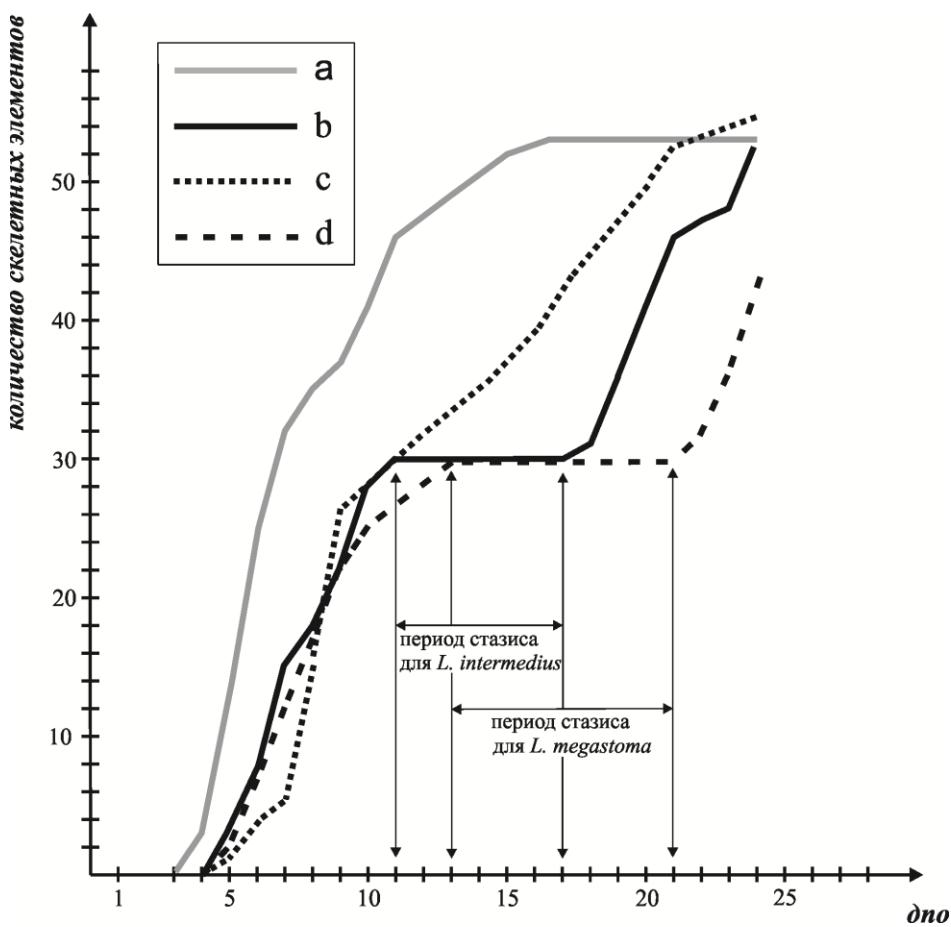


Рис. 6. Динамика появления хрящевых и костных элементов черепа трёх видов усачей. (а) в хондрокраниуме всех трёх видов; в остеокраниуме (б) *L. intermedius*, (в) *L. brevicephalus*, (г) *L. megastoma*

Так, при оссификации хрящевого *palatoquadratum* у *Labeobarbus* формируются замещающие кости: *quadratum* и *metapterygoideum*. Первой у трёх видов на 7 или 8 дпо появляется *quadratum*. *Metapterygoideum* появляется позже и в разное время: 12 дпо у *L. brevicephalus*, 19 дпо у *L. intermedius* и 22 дпо у *L. megastoma*. Таким образом, разница между появлением обеих костей у указанных видов составляет 4, 12 и 15 дней соответственно. Ускоренное развитие *metapterygoideum* у *L. brevicephalus*, вероятно, может приводить к занятию данной костью большей по сравнению с *L. intermedius* территории в ходе «конкуренции» с *quadratum* за единое пространство хряща. У *L. megastoma*, напротив, следует ожидать несколько меньших размеров *metapterygoideum*. Вследствие этого в обоих случаях может изменяться также форма и размеры *quadratum*. И действительно, методами геометрической морфометрии с использованием пакета программ TPS были выявлены

статистически значимые ($p \leq 0,001$) различия в форме quadratum у трех исследованных видов (Ф.Н. Шкиль, личное сообщение).

Ранее роль подобных взаимодействий в детерминации формы и размеров костей черепа была выявлена и в ряде экспериментальных работ. При удалении или недоразвитии определённых окостенений их место могло быть занято соседними костями, разрастающимися сильнее обычного и приобретающими измененную форму (Tatarko, 1934; Corsin, 1968; Leibel, 1976; Lebedkina, 1986). Кроме того, важную роль в развитии костного черепа играют и индукционные взаимодействия (морфогенетические индукции sensu Шмальгаузен (1938)) между хрящом, выступающим в роли индуктора, и костью (Hanken, Hall, 1984). Выраженная относительно *L. intermedius* хронологическая диссоциация процессов хондро- и остеокраниогенеза у *L. brevicephalus* и *L. megastoma*, вероятно, могла приводить к флюктуациям индукционных эффектов и дополнительным изменениям в форме и размерах отдельных костей.

Таким образом, в результате суммирования небольших гетерохронных изменений на ранних стадиях онтогенеза могли возникать предпосылки для выраженных различий, как в форме отдельных костей, так и в пропорциях всего черепа, демонстрируемых взрослыми особями *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma*. Так как именно пропорции черепа и отдельных костей являются отличительными признаками разных видов танских усачей, результаты исследования свидетельствуют в пользу гипотезы о вероятной роли гетерохроний в морфологической дивергенции пучка видов больших усачей озера Тана.

В ходе эксперимента по установлению роли тиреоидных гормонов в краниогенезе *L. intermedius* была выявлена широкая вариабельность реакции скелетных элементов на искусственное повышение уровня ТГ. Все исследованные кости первого и по большей части второго пика остеогенеза были разделены на две группы. К первой группе были отнесены кости со слабой ТГ-реактивностью – кости, практически не изменяющие времени появления под действием повышенной концентрации ТГ. Ко второй группе были отнесены кости с сильной ТГ-реактивностью – кости, чьё появление в условиях гипертиреоидизма смешалось на более ранний срок.

К первой группе принадлежат все кости, в норме появляющиеся в ходе первого пика остеогенеза (Рис. 5). Ко второй – практически все кости второго пика остеогенеза: *coronomeckiale* (разница между появлением в норме и при гипертиреоидизме составляет 9 дней), *metapterygoideum* (11 дней), *supraethmoideum* (12 дней), *sphenoticum* (9 дней), *palatinum* (13 дней), *vomer* (14 дней), *frontale* (более 15 дней), *lateroethmoideum* и *infraorbitale* 1 (более 16 дней) (Рис. 5). Ранее была установлена очень сильная ТГ-реактивность

infraorbitalia 2–5, появлявшихся при гипертиреоидизме на 30–40 дней раньше нормы (Shkil et al., 2012).

Вследствие различной реакции скелетных элементов черепа на воздействие ТГ экспериментальное повышение уровня ТГ индуцирует ряд изменений как в ходе краиногенеза, так и в дефинитивной морфологии особей.

1) Из-за более раннего появления ТГ-реактивных костей остеокраиногенез ускоряется. Так, на 15 дпо в остеокраинуме *L. intermedius* в норме насчитывается около 30 различных костей, а при повышении уровня ТГ – уже около 40 (Рис. 5, 7).

2) Вследствие различной ТГ-реактивности хондро- и остеокраинума, развитие костного черепа оказывается в целом ускоренным по отношению к хрящевому черепу, более инертному к воздействию гормона (Рис. 7).

3) ТГ-реактивные кости, в норме появляющиеся в ходе второго пика остеогенеза, изменяют сроки появления и «смещаются» на период стазиса в условиях гипертиреоидизма. В результате период стазиса укорачивается или полностью утрачивается (Рис. 5, 7).

4) Для ряда ТГ-реактивных костей в условиях гипертиреоидизма наблюдалось значительное сокращение временных интервалов появления.

5) Из-за различной ТГ-реактивности костей черепа происходит изменение последовательности их появления при гипертиреоидизме.

6) При повышении уровня ТГ наблюдается ускоренный линейный рост некоторых костей. Вероятно, он лежит в основе изменения формы и пропорций всего черепа в дефинитивном состоянии: для особей, выращенных при гипертиреоидизме, зачастую отмечалось удлинение нижней челюсти, мопсовидность и изменение положения рта (Шкиль и др. 2010а).

7) У большинства особей, развивающихся при повышенной концентрации ТГ, в дефинитивном состоянии отсутствует *kinethmoideum*, а количество *infraorbitalia* уменьшено с 5 до 4 или, гораздо реже, 3 (Shkil et al., 2012).

Указанные ТГ-индуцированные изменения динамики краиногенеза *L. intermedius* сближают её с динамикой *L. brevicephalus*, у которого: 1) нет стазиса, 2) развитие остеокраинума ускорено относительно развития хондрокраинума и 3) временные интервалы появления в целом заметно короче, чем у *L. intermedius* в норме (Рис. 7).

При выращивании личинок *L. intermedius* в условиях искусственного дефицита ТГ наблюдаются противоположные изменения динамики краиногенеза, сближающие её с динамикой *L. megastoma*. Кроме того, обнаруживается ряд изменений в дефинитивной морфологии, в результате чего у части особей *L. intermedius* проявляются фенотипические черты *L. megastoma* (Шкиль и др., 2010а).

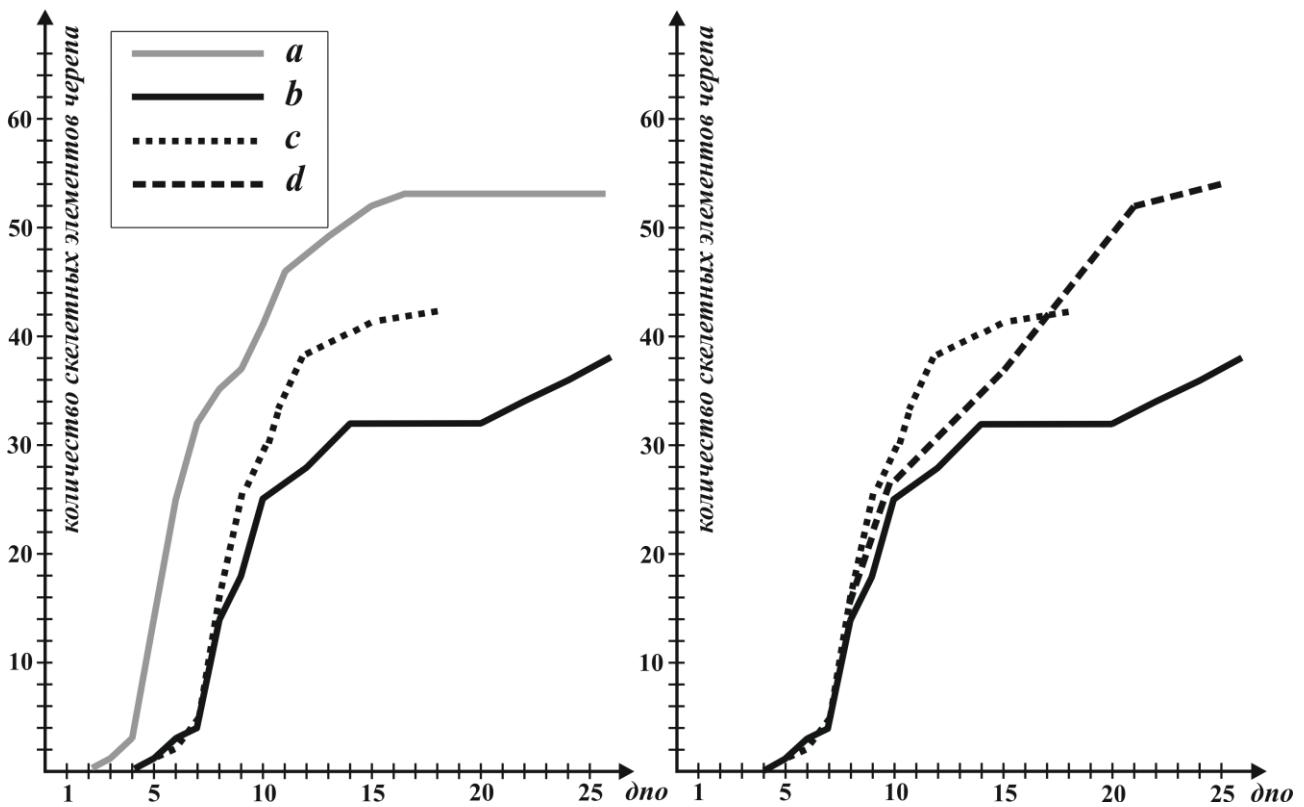


Рис. 7. Динамика появления крациальных элементов у *L. brevicephalus* и *L. intermedius*.
 (а) появление хрящев у двух видов; (б) появление костей черепа у *L. intermedius* в норме и
 (с) в условиях гипертиреоидизма; (д) появление костей черепа у *L. brevicephalus* в норме.

Представляется маловероятным, что подобное сходство является результатом случайных совпадений. Гораздо более вероятно, что гетерохронные различия – индукторы морфологической дивергенции, выявленные в крациогенезе исследованных видов усачей – обусловлены различиями в тиреоидной физиологии указанных видов.

Ранее было показано, что количество чешуй в боковой линии, лучей в плавниках, глоточных зубов и подглазничных костей, характеризующееся высокой вариабельностью в природной популяции *L. intermedius*, является ТГ-зависимым признаком – уменьшается при гипертиреоидизме и увеличивается в условиях ТГ-дефицита (Шкиль и др. 2010а). При этом, напротив, количество позвонков – практически инвариабельный в природной популяции признак – не зависит от уровня ТГ (Smirnov et al., 2012б).

Подобный же феномен отмечен и в крациогенезе *L. intermedius*: отнесённые к «ТГ-слабореактивным» кости первого пика остеогенеза практически инвариабельны по времени своего появления (узкий временной интервал появления). Напротив, более поздним «ТГ-сильнореактивным» костям второго пика остеогенеза зачастую присуща широкая вариабельность в сроках появления (широкий временной интервал появления).

Показано, что продолжительность периода стазиса в краиногенезе *L. intermedius* зависит от уровня ТГ. Этот же признак – продолжительность стазиса – широко варьирует в ходе нормального развития *L. intermedius* как в пределах потомства одного кросса, так и между потомствами от разных родителей.

Широкая природная вариабельность именно ТГ-зависимых признаков указывает на то, что *L. intermedius* озера Тана присущ широкий диапазон изменчивости в активности тиреоидной оси, или – в тиреоидной физиологии. На это же указывают результаты иммуноферментного анализа: среди пяти видов танских усачей, включая *L. intermedius*, *L. brevicephalus* и *L. megastoma*, самый широкий диапазон изменчивости по уровню ТГ в плазме крови присущ именно *L. intermedius* (Ф. Н. Шкиль, личное сообщение). Иными словами, в природной популяции *L. intermedius* озера Тана представлено широкое разнообразие тиреоидных фенотипов sensu Crockford (2004).

Вариации тиреоидного статуса (изменения тиреоидной физиологии) у костистых рыб оказывают существенное влияние на внешнюю морфологию (Brown, 1997; Okada et al., 2005), протекание метаболических процессов (Leatherland, 1994; Oomen et al., 2006), поведение (de Jesus et al., 1998) и многие другие аспекты биологии. Даже небольшое изменение в активности тиреоидной оси может вызывать целый комплекс скоординированных изменений в морфологии, физиологии, поведении и т.д.

Теоретически, даже единственная мутация, затрагивающая состояние любого компонента тиреоидной оси, может вызывать глубокие, но в то же время скоординированные, наследуемые изменения состояний различных признаков организма – то есть быстрые эволюционные изменения. Реалистичность столь быстрых эволюционных преобразований морфологии, физиологии и экологии, базирующихся на изменениях тиреоидного статуса, была продемонстрирована на примере происхождения эндемичного вида карпозубика *Cyprinodon diabolis* (Teleostei; Cyprinodontidae), адаптировавшегося к условиям обитания при экстремально высоких (до 38⁰С) температурах (Lema, Nevitt, 2006).

У рыб в пределах вида разные популяционные группировки могут иметь разные тиреоидные фенотипы. Так, у колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei; Gasterosteidae) морская и речная формы различаются тиреоидной физиологией – их тиреоидные фенотипы адаптивны, соответственно, к обитанию в морских и речных условиях. Обе формы значительно отличаются и по внешней морфологии (Kitano et al., 2010).

Можно предположить, что широкое разнообразие тиреоидных фенотипов, присущее современной популяции танских *L. intermedius*, было характерно и для анцестральной популяции во время заселения озера Тана. С большой долей вероятности некоторые из них

оказались адаптивны для обитания в определенных биотопах нового местообитания, а их обладатели – преадаптированы на гормональном уровне к новым местам обитания.

Подобная адаптация к различным условиям среды должна была сопровождаться стремительной дивергенцией предпочтаемых большими усачами местообитаний, что в свою очередь, согласно де Граафу с соавторами (2008), приводило к трофической дивергенции и дальнейшей адаптивной радиации.

Различия в тиреоидной физиологии, обусловившие быстрое расхождение по разным биотопам, оказались, как показало данное исследование, и на морфологической диверсификации танских усачей. Различия в скорости онтогенетических процессов, связанные с различиями в активности тиреоидной оси, через вызванные ими гетерохронии оказались на дефинитивной морфологии, создав широкий спектр морфологических типов строения, демонстрируемый пучком видов больших африканских усачей озера Тана.

Несомненно, предложенный выше эволюционный сценарий является чисто гипотетическим. Однако, обнаруженные в ходе данного исследования факты свидетельствуют в пользу того, что участие гормональных факторов в диверсификации больших танских усачей более, чем вероятно.

Выводы

1) Процессы хондрокраиногенеза изученных видов танских *Labeobarbus* являются высоко консервативными. Процессы остеокраиногенеза менее консервативны: при сходной последовательности появления костей динамика их появления существенно различается.

2) Сравнительный анализ морфогенеза черепа изученных видов *Labeobarbus* выявил гетерохронии раннего онтогенеза в линии предок – потомок: процессы развития остеокраинума *L. brevicephalus* ускорены, а процессы развития остеокраинума *L. megastoma* замедлены по отношению к процессам морфогенеза остеокраинума анцестрального вида *L. intermedius*.

3) При консервативном характере протекания хондрокраиногенеза гетерохронии процессов остеокраиногенеза приводят к частичной временной диссоциации: развитие костного черепа ускорено относительно развития хрящевого черепа у *L. brevicephalus* и замедлено – у *L. megastoma*.

4) Из-за различий во временных параметрах краиногенеза одни и те же кости черепа у трёх исследованных видов усачей появляются, растут и дифференцируются в условиях

различного пространственного окружения, что может приводить к различиям в их дефинитивной форме и размерах.

5) Тиреоидные гормоны ускоряют темпы остеогенеза, не влияя на темпы хондрогенеза черепа, что приводит к ускоренному развитию костного черепа относительно хрящевого. Динамика процессов краниогенеза *L. intermedius* в условиях гипертиреоидизма проявляет заметное сходство с динамикой нормального краниогенеза *L. brevicephalus*.

6) Кости черепа *L. intermedius* различаются по ТГ-реактивности, вследствие чего повышение уровня ТГ приводит к изменению последовательности появления элементов остеокраниума.

7) Количество костей в дефинитивном черепе *L. intermedius* и их форма изменяются в зависимости от уровня ТГ, что может приводить в свою очередь к изменению формы и пропорций всего черепа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

- 1) Шкиль Ф.Н., **Борисов В.Б.**, Абдисса Б., Смирнов С.В. 2010а. Роль гормона щитовидной железы в онтогенезе и морфологической диверсификации *Barbus intermedius* sensu Banister озера Тана, Эфиопия // Онтогенез. 41(6): 438-450.
- 2) Шкиль Ф.Н., **Борисов В.Б.**, Смирнов С.В. 2010б. Влияние тиреоидного гормона на последовательность появления костей черепа в раннем онтогенезе большого африканского усача (*Labeobarbus intermedius*; Cyprinidae; Teleostei) // Доклады Академии Наук. 432: 571-583.
- 3) Смирнов С.В., **Борисов В.Б.**, Абдисса Б., Шкиль Ф.Н. 2012. Сравнительный анализ развития черепа африканских усачей (*Labeobarbus* (=*Barbus*); Cyprinidae; Teleostei) озера Тана (Эфиопия) // Доклады Академии Наук. 442(1): 136-138.
- 4) **Borisov V.B.**, Shkil F.N., Abdissa B. and Smirnov S.V. 2012. Development of the cranium in the Large African hexaploid barb *Labeobarbus* (=*Barbus*) *intermedius* (Cyprinidae; Teleostei) // Journal of Ichthyology. 52(11): 838-860.
- 5) Shkil F.N., Kapitanova D.V., **Borisov V.B.**, Abdissa B. and Smirnov S.V. 2012. Thyroid hormone in skeletal development of cyprinids: effects and morphological consequences // J. Appl. Ichthyol. 28: 398-405.

6) Smirnov S.V., **Borisov V.B.**, Kapitanova D.V., Abdissa B. and Shkil F.N. 2012a. Heterochronies in skull development of Lake Tana large African barbs (*Labeobarbus*; Cyprinidae; Teleostei) // J. Appl. Ichthyol. 28: 406-410.

7) Smirnov S.V., Kapitanova D.V., **Borisov V.B.**, Abdissa B. and Shkil F.N. 2012b. Lake Tana large barbs diversity: developmental and hormonal bases // Journal of Ichthyology. 52(11): 861-880.

Публикации в других изданиях:

8) **Борисов В.Б.**, Шкиль Ф.Н. 2010. Влияние гормона щитовидной железы на ранний краиногенез большого африканского усача *Barbus intermedius* (Teleostei; Cyprinidae). Материалы Конференции молодых сотрудников и аспирантов Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых». Москва. С. 50-58.

Тезисы:

9) **Борисов В.Б.**, Шкиль Ф.Н., Смирнов С.В. 2010. Влияние тиреоидных гормонов на ранний краиногенез *Barbus intermedius* (Teleostei; Cyprinidae). Тезисы докл. VIII Международной конференции по раннему онтогенезу рыб и промысловых беспозвоночных. Светлогорск. С. 19-20.

10) **Борисов В.Б.**, Шкиль Ф.Н. 2011. Роль гетерохроний в морфологической дивергенции больших африканских усачей оз. Тана (Эфиопия) (*Labeobarbus*; Teleostei; Cyprinidae). Тезисы докладов XVIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2011». Москва. С. 132-133.

11) **Borisov V.B.**, Shkil F.N., Abdissa B., Smirnov S.V. 2011. Heterochronies in skull development of Lake Tana large African barbs (*Labeobarbus*; Cyprinidae; Teleostei). Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology. Tavira (Portugal). P. 38.

12) Shkil F.N., **Borisov V.B.**, Kapitanova D.V., Abdissa B., Smirnov S.V. 2011. Alternations of thyroid hormone level in the early development of Cyprinidae (Teleostei): ontogenetic effects and phylogenetic implications. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology. Tavira (Portugal). P. 21.

13) **Борисов В.Б.**, Шкиль Ф.Н. 2012. Влияние тиреоидного гормона на морфогенез черепа *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). Тезисы докладов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2012». Москва. С. 9-10.

14) **Борисов В.Б.**, Шкиль Ф.Н. 2012. Сравнительный анализ морфогенеза черепа различных видов больших африканских усачей озера Тана. Тезисы докл. V конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых». Москва. С.12.

15) **Borisov V.B.**, Shkil F.N., Abdissa B., Smirnov S.V. 2012. Heterochronies in skull development of Lake Tana large African barbs (*Labeobarbus*; Cyprinidae; Teleostei). XIV European Congress of Ichthyology. Liege (Belgium). P. 27.