

УДК [591.465.12+591.465.13] (597.95)

doi: 10.17223/19988591/32/7

В.В. Ярцев¹, Ж.-М. Эксбрая², В.Н. Куранова¹

¹Томский государственный университет, г. Томск, Россия

²Католический университет Лиона,

Практическая школа высших исследований, г. Лион, Франция

Оогенез сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae)

Работа выполнена в рамках Программы конкурентоспособности
Томского государственного университета.

Оогенез *Salamandrella keyserlingii* изучен у самок, отловленных в окрестностях г. Томска (Западная Сибирь), с разным состоянием половой системы. Работа основана на гистологическом исследовании яичников. Описаны все стадии (Ст.) оогенеза вида. Ст. 1 – оогонии (14,16–26,43 мкм), расположены одиночно или группами в стенке яичника. Ст. 2 – превителлогенетические ооциты (93,67–372,89 мкм): цитоплазма свободна от желтка, зона pellucida отсутствует. Ст. 3 – ранние вителлогенетические ооциты (389,4–598,6 мкм): по периферии цитоплазмы появляются желточные гранулы, зона pellucida становится выраженной. Ст. 4 – вителлогенетические ооциты (527,8–711,7 мкм) с широкой зоной желточных гранул по периферии клетки, свободная от желтка цитоплазма присутствует. Ст. 5 – поздние вителлогенетические ооциты (647,6–1163,4 мкм): почти весь объем цитоплазмы заполнен желточными гранулами, по периферии клетки заметно скопление зёрен меланина. Ст. 6 – зрелые ооциты (1258,6–1696,5 мкм): меланин в виде плотного скопления в субмембранном пространстве клетки, по количеству и характеру распределения желтка соответствует яйцам мезо- и телолецитального типов. Кроме того, описана микроструктура постовуляционных и атретических фолликулов.

Ключевые слова: Hynobiidae; яичник; оогоний; ооцит; овариальный фолликул; атретический фолликул; постовуляционный фолликул.

Введение

Сибирский углозуб, *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870, – вид, имеющий самое обширное распространение среди других хвостатых земноводных [1, 2]. Значительная часть ареала расположена в неблагоприятных для других хвостатых земноводных климатических условиях. В связи с этим сибирский углозуб имеет ряд адаптаций к экстремальным температурам [1]. Обитание в холодных регионах определяет и особенности биологии размножения вида [1, 3], изучение которых представляет значительный интерес.

Анализ гистологических и морфологических характеристик половой системы самок сибирского углозуба позволил предположить существование у них двухлетнего репродуктивного цикла [3–7]. Однако подчёркивается, что для однозначного решения данного вопроса необходимо использование подхода, аналогичного тому, который реализован при изучении репродуктивного цикла самок *Hynobius nigrescens* [8]. Несмотря на наличие ряда работ, посвящённых репродуктивному циклу самок *S. keyserlingii*, особенности микроstructures овариальных фолликулов разных стадий созревания в настоящее время не описаны. В данной работе исследованы основные этапы оогенеза самок сибирского углозуба, описана микроструктура овариальных фолликулов, что представляет интерес для дальнейших исследований репродуктивного цикла самок данного вида.

Материалы и методики исследования

Материалом для настоящей работы послужили самки, отловленные с помощью стандартной ловчей траншеи [9] в окрестностях г. Томска (Западная Сибирь, 56°28'N, 84°58'E) с апреля по август 2005, 2006 и 2013 гг. (таблица). У исследованных животных ($n = 16$) измеряли длину тела (L, мм: по схеме А. М. Басарукина, Л. Я. Боркина [10]). При описании состояния половой системы использовали предложенную ранее схему, основанную на длине тела, окраске преобладающих фолликулов и состоянии яйцеводов [3, 7].

Периоды отлова, длина тела (L, мм) и состояние половой системы исследованных самок сибирского углозуба, *Salamandrella keyserlingii* (Западная Сибирь, окрестности г. Томска)

[Trapping periods, body size (L, mm), and reproductive system state of *Salamandrella keyserlingii* females (Western Siberia, suburbs of Tomsk)]

Период отлова [Trapping period]	L, мм [SVL*, mm]	Состояние половой системы [Reproductive system state]
Май [May] 2006	53,5 57,4	До икрометания: основную часть яичника составляют крупные чёрные фолликулы (диаметр около 2 мм), яйцеводы сильно вздуты [Before spawning: the main part of an ovary consisted of large black follicles (their diameter was over 2 mm), and oviducts were greatly swollen]
Май [May] 2013	55,6	Во время овуляции: яичник крупный, преобладают белые мелкие фолликулы, единичные – чёрные крупные, яйцеводы вздуты [During ovulation: rather large ovary with numerous small white follicles and several large black follicles, and swollen oviducts]
Май [May] 2009	52,3	После икрометания: яичник бесформенный, относительно крупный, с мелкими белыми фолликулами (до 0,5 мм), яйцеводы вздуты [After spawning: rather large shapeless ovary with small white follicles (up to 0.5 mm), and swollen oviducts]

О к о н ч а н и е т а б л и ц ы [Table end]

Период отлова [Trapping period]	L, мм [SVL*, mm]	Состояние половой системы [Reproductive system state]
Июнь [June] 2006 Июль [July] 2005	45,6 53,4	Компактный мелкий яичник, большую часть которого составляют мелкие прозрачные фолликулы (менее 0,5 мм), отдельные фолликулы белые, непрозрачные (около 0,5 мм), яйцеводы тонкие [Small compact ovary, the main part of which consisted of small transparent follicles (less than 0.5 mm), some follicles were white–opaque (about 0.5 mm), and oviducts were thin]
Июль [July] 2006	52,7	Яичник компактный, на фоне множества мелких фолликулов выделяются отдельные более крупные (0,5–0,7 мм), окрашенные в белый цвет [Compact ovary having many small follicles, but some separate follicles were large (0.5–0.7 mm) with white color, and oviducts were slightly swollen]
Июль [July] 2006	49,8 53,1 52,4	Яичник крупный, фолликулы около 1 мм и более с хорошо выраженной зелёной окраской у нефиксированных образцов и жёлтой – у фиксированных [Large ovary, the diameter of follicles was about 1 mm and more with well-defined mint green color in fresh (unfixed) and yellow color in formalin fixed samples]
Июль [July] 2006 Август [August] 2005 Август [August] 2006	51,6 52,4 49,2 54,0	Фолликулы яичника разнородные (мелкие белые (менее 1 мм), средние (1 мм и более) – зелёные, крупные (более 1,5 мм) – чёрные, их соотношение варьирует), яйцеводы вздуты [Heterogeneous ovarian follicles with various ratios of follicles from small white (less than 1 mm), through medium-sized green (1 mm and more), to large black (more than 1.5 mm); and swollen oviducts]
Август [August] 2005 Август [August] 2006	46,9 45,4	Яичник с преобладанием чёрных фолликулов (более 1,5 мм), яйцеводы вздуты [Ovary with a predominance of black follicles (more than 1.5 mm), and swollen oviducts]

Note: * snout-vent length: distance from the tip of the snout to the anterior angle of the vent.

Для гистологического исследования у экземпляров, фиксированных в 4%-ном растворе формальдегида (=10%-ном растворе формалина), вырезали левый яичник. Дальнейшую обработку проводили по стандартным гистологическим методикам [11, 12]. Образцы обезжизняли в растворах этанола возрастающей крепости, просветляли в бутаноле и заключали в парафин. Сагиттальные срезы толщиной 5–7 мкм изготавливали на ротационных микротоммах Leica RM2125RT (Leica Microsystems, Германия) и RMD–3000 (Mt Point, Россия). Срезы монтировали на предметные стёкла с помощью белок-глицериновой смеси или использовали стёкла класса Super Frost (Menzel-Gläser, Германия). Для обзорных целей срезы окрашивали гематоксилином Майера–эозином и модифицированным азановым методом.

Для гистохимического выявления кислых мукополисахаридов использовали окрашивание альциановым синим (рН = 0,5 и 2,5) и простых полисахаридов – ШИК-реакцию.

Микроскопию препаратов и изготовление снимков осуществляли с помощью микроскопа AxioLab.A1 с микрофотокамерой AxioCam ERc 5s и программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy, Германия). В качестве дополнительной характеристики оогониев и ооцитов рассчитан средний диаметр клетки на основе измерений максимального и минимального диаметров. Для характеристики каждой стадии использовано по 10 срезов клеток. В измерения включены только те срезы ооцитов, на которых присутствовали ядра с ядрышками. Цитоморфометрические измерения проведены с использованием программы AxioVision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Результаты исследования и обсуждение

Яичники самок сибирского углозуба имеют вид мешковидных структур с центральной полостью, заполненной лимфой. Эта полость ограничена внутренней текой, за которой следует соединительнотканная строма с полыми клетками, а затем – наружная тека. Последняя образована мезотелем, отграничивающим яичник от полости тела. У исследованных самок сибирского углозуба выявлены половые клетки всех стадий созревания – от оогониев до зрелых ооцитов, а также постовуляционные и атретические фолликулы. Ввиду взаимосвязи роста ооцита и фолликулогенеза эти процессы будут рассмотрены совместно.

Оогонии (стадия 1) – самые мелкие клетки овариального цикла, их средний диаметр составляет 20,9 мкм ($\text{lim} = 14,16\text{--}26,43$; $n = 10$) (рис. 1, А). Они располагаются одиночно или группами среди фолликулярных клеток в стенке яичника. Каждый оогоний контактирует с несколькими фолликулярными клетками. Цитоплазма оогониев светлая, ядро овальное, обычно располагается по центру и содержит гранулярный хроматин. Фолликулярные клетки, окружающие оогонии, имеют треугольные, палочковидные и овальные ядра.

Превителлогенетический ооцит (стадия 2). Превителлогенетические ооциты в сравнении с оогониями характеризуются более крупными размерами – 230,77 мкм ($\text{lim} = 93,67\text{--}372,89$; $n = 10$), наличием связей с большим количеством фолликулярных клеток (см. рис. 1, В, С). Ядра мелких (ранних) ооцитов имеют одно ядрышко. Однако у более крупных ооцитов по периферии ядра хорошо заметны множество ядрышек (рис. 1, В). Основной объём ядра занимают хромосомы типа «ламповых щёток». Цитоплазма ранних превителлогенетических ооцитов сравнительно однородна. По мере роста ооцита она становится гранулярной, в ней появляются крупные светлые нерегулярной формы структуры с зернистым материалом. В некоторых случаях эти области характеризуются положительной окраской альциановым

синим (рН = 2,5) (рис. 1, В) или ШИК-методом (см. рис. 1, С). Фолликулярные клетки имеют как типичную плоскую форму (их цитоплазма вытянута вдоль растущего ооцита, ядра вытянутые, палочковидные) (рис. 1, В), так и кубическую, характерную для следующих стадий (рис. 1, С). *Zona pellucida* не выражена на этой стадии (рис. 1, С).

Ранний вителлогенетический ооцит (стадия 3). Ооциты данной стадии имеют средний диаметр 494,70 мкм ($\text{lim} = 389,39\text{--}598,61$; $n = 10$) (рис. 1, D–F). Наиболее явные изменения в них – это появление желточных гранул по периферии клетки и наличие *zona pellucida*. Ядра ооцитов находятся в таком же состоянии, как и на предыдущей стадии: в них хорошо различимы хромосомы типа «ламповых щёток» и множество периферических ядрышек разных размеров. Свободная от желтка цитоплазма становится более гетерогенной: в области вокруг ядра просматриваются различной формы более светлые участки, гранулярные и фибриллярные структуры. Откладка желтка происходит оппозиционно и распространяется к центру клетки. Желточные гранулы эозинофильные, а также окрашиваются в жёлто-оранжевый цвет азановым методом, в тёмно-фиолетовый – ШИК-методом, в серо-коричневый – альциановым синим (рН = 0,5 и 2,5). *Zona pellucida* характеризуется положительной ШИК-реакцией (рис. 1, F). Фолликулярные клетки кубической формы, имеют крупные овальные ядра с ядрышками и гранулярным хроматином.

Вителлогенетический ооцит (стадия 4). Ооциты данной стадии имеют средний размер – 634,52 мкм ($\text{lim} = 527,78\text{--}711,70$ мкм; $n = 10$) (рис. 2, A, B). Их цитоплазма дифференцирована на широкую периферическую зону с желточными гранулами разных размеров и центральную часть (вокруг ядра), свободную от желтка. Периферические желточные гранулы мелкие, по мере приближения к центру клетки их размеры увеличиваются. Крупное овальное ядро ооцита имеет волнистую границу и содержит хорошо выраженные ядрышки (см. рис. 2, B). В целом состояние фолликулярных клеток и *zona pellucida* соответствуют таковым стадии 3.

Вителлогенетический ооцит (стадия 5). Ооциты имеют размеры 875,30 мкм ($\text{lim} = 647,58\text{--}1163,36$; $n = 10$) (рис. 2, C, D). В целом они сходны с ооцитами предыдущей стадии, от которых отличаются следующим: 1 – свободная от желтка цитоплазма практически отсутствует, желточные гранулы заполняют почти весь объём клетки до ядра (рис. 2, C); 2 – в периферических участках цитоплазмы появляются зёрна меланина тёмно-коричневого цвета (рис. 2, D). *Zona pellucida* хорошо развита. Вокруг некоторых ооцитов расположены фолликулярные клетки кубической формы, их крупные ядра с гранулярным хроматином. Вокруг других ооцитов – фолликулярные клетки плоской формы: цитоплазма вытянута вдоль поверхности ооцита, длинные палочковидные ядра окрашены гомогенно.

Зрелый ооцит (стадия 6). Ооциты перед овуляцией имеют размеры 1534,33 мкм ($\text{lim} = 1258,65\text{--}1696,50$; $n = 10$). Практически весь объём клетки занимает желток (рис. 2, E).

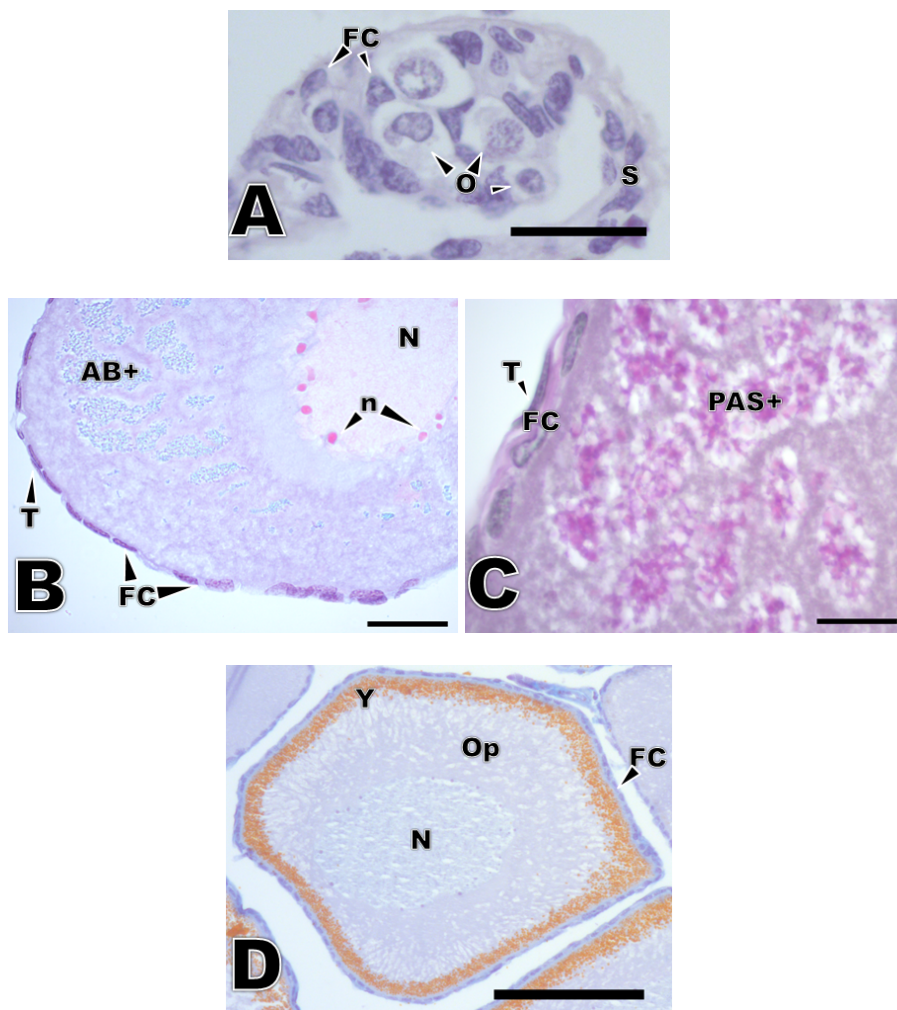
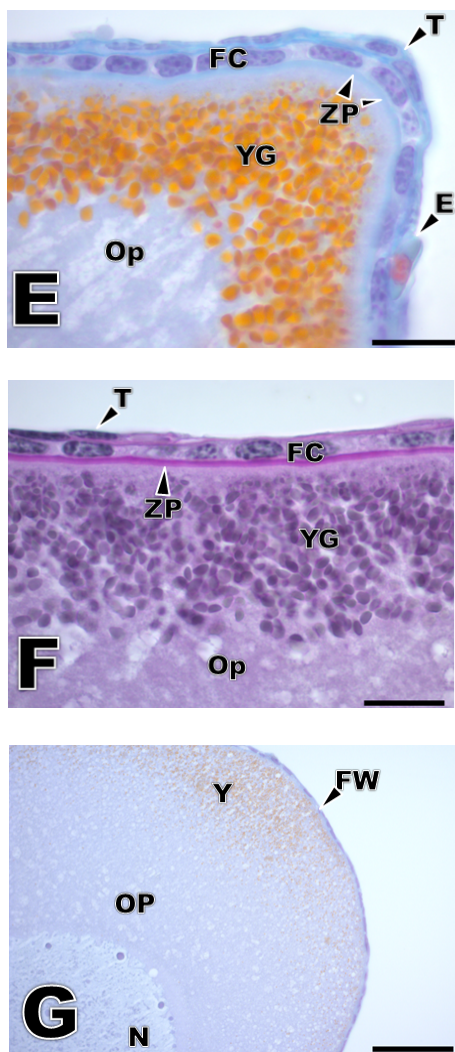


Рис. 1. Ранние этапы оогенеза *Salamandrella keyserlingii*: *A* – группа оогониев в стенке яичника (стадия 1); *B* – фрагмент превителлогенетического фолликула (стадия 2); *C* – периферический участок превителлогенетического фолликула; *D* – ранний вителлогенетический фолликул (стадия 3); *E, F* – периферические участки раннего вителлогенетического фолликула; *G* – ранний вителлогенетический фолликул с дисперсным распределением желтка. Окраска: *A* – гематоксилин Майера–эозин; *B* – альциановый синий, pH = 2,5; *C, F* – ШИК-метод; *D, E, G* – модифицированный азановый метод. Шкалы: *A, B* – 50 мкм; *C, E, F* – 20 мкм; *D* – 200 мкм; *G* – 100 мкм. Микрофотографии В.В. Ярцева.
AB+ – положительная реакция с альциановым синим (pH = 2,5); *Y* – желток; *YG* – желточные гранулы; *O* – оогонии; *S* – строма; *FW* – стенка фолликула;



T – тека; *FC* – фолликулярные клетки; *Op* – цитоплазма (ооплазма), свободная от желтка; *PAS+* – ШИК-положительная реакция; *E* – эритроцит;

N – ядро; *n* – ядрышко; *ZP* – *zona pellucida*

[**Fig. 1.** Early stages of oogenesis in *Salamandrella keyserlingii*: *A* - nest of oogonia in the wall of the ovary (Stage 1); *B* - part of the previtellogenic follicle (Stage 2); *C* - peripheral part of the previtellogenic follicle; *D* - early vitellogenic follicle (Stage 3); *E*, *F* - peripheral part of the early vitellogenic follicle; *G* - early vitellogenic follicle with dispersed yolk granules.

Staining: *A* - Mayer's hematoxylin-eosin; *B* - pH 2.5 alcian blue; *C*, *F* - PAS-method;

D, *E*, *G* - azan modified. Scales: *A*, *B* - 50 μ m; *C*, *E*, *F* - 20 μ m;

D - 200 μ m; *G* - 100 μ m. Micrographs by VV Yartsev.

AB+: alcian blue positive reaction (pH = 2.5), FC: follicle cells, Y: yolk, YG: yolk granules,

O: oogonia, S: stroma, FW: follicular wall, T: theca of follicle, Op: ooplasm, PAS+: PAS positive reaction, E: erythrocyte, N: nucleus, n: nucleolus, ZP: *zona pellucida*]

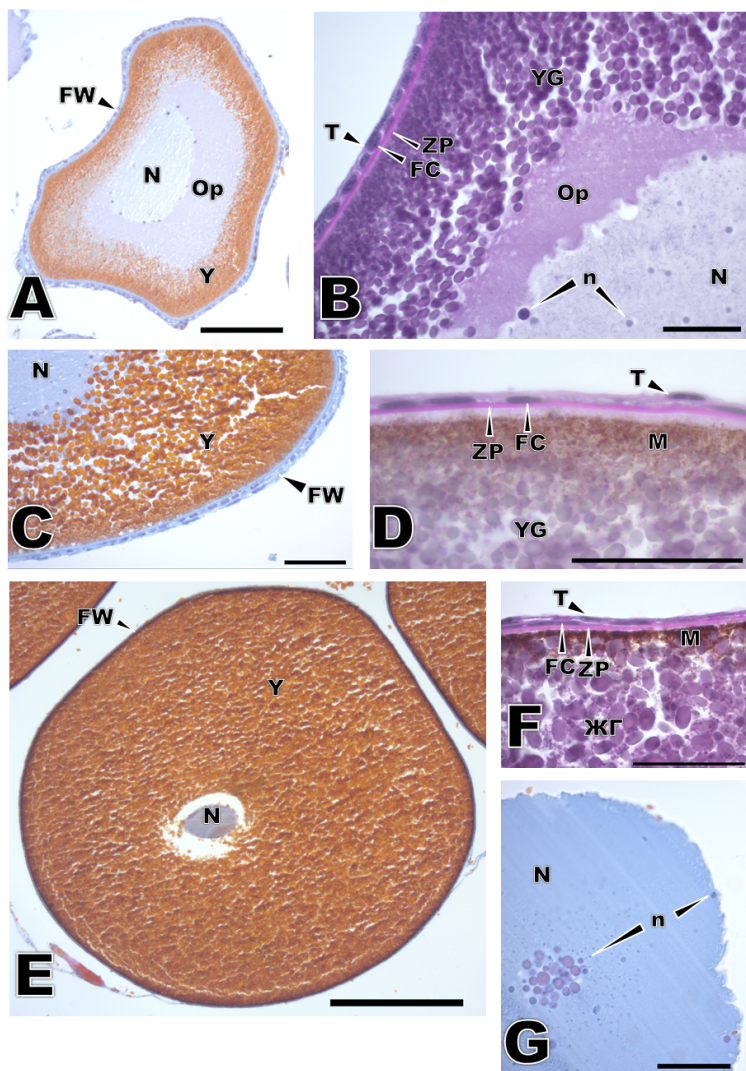


Рис. 2. Поздние этапы оогенеза *Salamandrella keyserlingii*: *A* – вителлогенетический фолликул (стадия 4); *B* – фрагмент вителлогенетического фолликула (стадия 4); *C* – фрагмент вителлогенетического фолликула (стадия 5); *D* – периферический участок вителлогенетического фолликула (стадия 5); *E* – зрелый фолликул (стадия 6); *F* – периферический участок зрелого фолликула; *G* – ядро зрелого фолликула. Окраска: *A, C, E, G* – модифицированный азановый метод; *B, D, F* – ШИК-метод. Шкала: *A, E* – 200 мкм; *B, D, F, G* – 50 мкм; *C* – 100 мкм. Микрофотографии В.В. Ярцева.

М – меланин, другие обозначения, как на рис. 1

[Fig. 2. Later stages of oogenesis in *Salamandrella keyserlingii*: *A* - vitellogenic follicle (Stage 4); *B* - peripheral part of vitellogenic follicle (Stage 4); *C* - part of vitellogenic follicle (Stage 5); *D* - peripheral part of vitellogenic follicle (Stage 5); *E* - postvitellogenic follicle (Stage 6); *F* - peripheral part of postvitellogenic follicle; *G* - nucleus (germinal vesicle) of postvitellogenic follicle. Staining: *A, C, E, G* - azan modified; *B, D, F* - PAS-method. Scales: *A, E* - 200 μ m; *B, D, F, G* - 50 μ m; *C* - 100 μ m. Micrographs by VV Yartsev. M: melanin granules, other abbreviations as in Fig. 1]

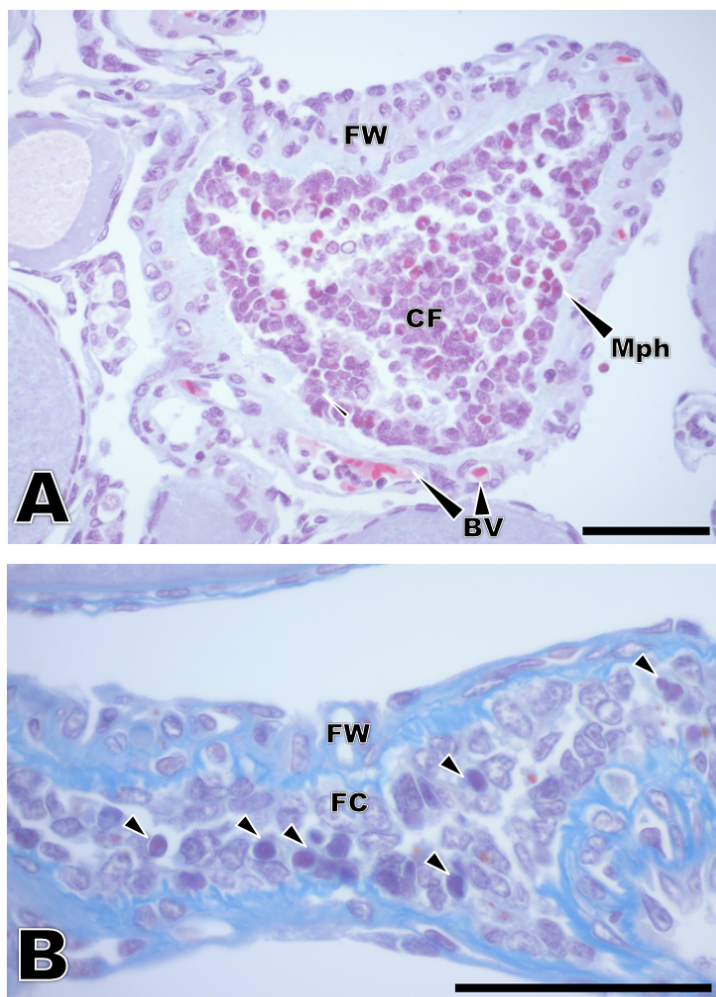


Рис. 3. Постовуляционные фолликулы яичника *Salamandrella keyserlingii*: *A* – ранний постовуляционный фолликул; *B* – поздний постовуляционный фолликул. Стрелки указывают на участки с гиперхромией и фрагментированными ядрами. Окраска: *A* – альциановый синий, pH = 2,5; *B* – модифицированный азановый метод. Шкала: 100 мкм. Микрофотографии В.В. Ярцева.

CF – полость фолликула; Mph – макрофаги;

BV – кровеносные сосуды; другие обозначения, как на рис. 1 и 2

[**Fig. 3.** Postovulatory follicles in the ovary of *Salamandrella keyserlingii*: *A* - early postovulatory follicle; *B* - late postovulatory follicle. Arrows: hyperchromic and fragmented nucleus. Staining: *A* - alcian blue, pH = 2.5; *B* - azan modified. Scale: 100 μ m. Micrographs by VV Yartsev. CF: cavity of the follicle, Mph: macrophages, BV: blood vessels, other abbreviations as in Figs. 1 and 2]

По его количеству яйцо мезолецитальное, а по характеру распределения – телолицетальное. Ядро несколько смещено к анимальному полюсу, имеет волнистые границы (см. рис. 2, *G*). В ядре хорошо различимо множество ядрышек, которые могут располагаться по периферии либо группой в его центре. В отличие от предыдущей стадии, меланин образует на поверхности яйца плотное тёмно-коричневое скопление (см. рис. 2, *F*). Фолликулярные клетки только плоского типа, *zona pellucida* выглядит, как на предыдущей стадии.

Постовуляционный фолликул. Выход ооцита из фолликула вызывает комплекс морфофизиологических изменений фолликулярных клеток и теки. Ранний постовуляционный фолликул характеризуется сильной васкуляризацией, причём в просветах более крупных сосудов находится значительное количество лейкоцитов (см. рис. 3, *A*). Клетки теки преобразуются из плоского эпителиального пласта в мощную оболочку с хорошо развитым волокнистым межклеточным веществом, богатым коллагеном (положительная реакция с анилиновым синим при окрашивании азановым методом). Ядра клеток теки крупные, полиморфные, с гранулярным хроматином: треугольные, овальные, круглые, часто многолопастные. Часть клеток имеют светлую цитоплазму. Полость постовуляционного фолликула заполнена массой фолликулярных клеток, среди которых хорошо заметно множество макрофагов с изогнутыми палочковидными или сегментированными ядрами и гранулярным хроматином.

В более поздних постовуляционных фолликулах васкуляризация стенок развита меньше (см. рис. 3, *B*). Часть фолликулярных клеток в полости фолликула характеризуются признаками деградации: гиперхромия, распад ядра (кариорексис), цитоплазма в виде тонкого ободка вокруг ядра либо фрагментирована.

Атретические фолликулы. У исследованных самок выявлена атрезия фолликулов различных стадий (рис. 4). В ходе деградации фолликула активное участие принимают фолликулярные клетки, которые увеличиваются в размерах. Их ядра становятся круглыми, овальными, с хорошо выраженными одним или несколькими ядрышками. На ранних стадиях атрезии, после нарушения целостности ооцита, фолликулярные клетки обнаруживаются не только по периферии фолликула, но и ближе к его центру (рис. 4, *A, B*). В этих клетках увеличивается ядро, в нём различимы одно или несколько ядрышек и гранулярный хроматин. Вероятно, данные изменения в структуре фолликулярных клеток и их положение в фолликуле связаны с их миграцией вглубь погибшего ооцита и фагоцитированием его фрагментов. Тека в этот период не вовлечена в процесс и имеет вид тонкой оболочки. На более поздних этапах фолликулярные клетки приобретают адипоцитоподобную морфологию. В них, а также частично в клетках теки, появляется коричневый пигмент (рис. 4, *C, D*). Тека увеличивается в объёмах, васкуляризуется.

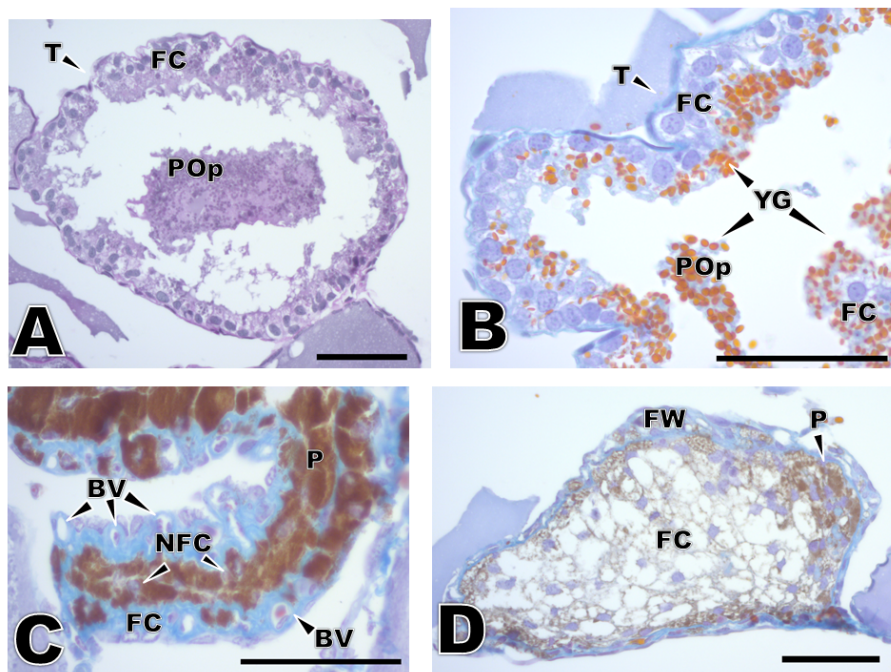


Рис. 4. Атретические фолликулы яичника *Salamandrella keyserlingii*:

A, B – фрагменты ранних атретических фолликулов; *C, D* – фрагменты поздних атретических фолликулов. Окраска: *A, B, D* – модифицированный азановый метод; *C* – ШИК-метод. Шкала: 100 мкм. Микрофотографии В.В. Ярцева.

POp – фрагменты цитоплазмы ооцита; NFC – ядра фолликулярных клеток; P – пигмент; другие обозначения, как на рис. 1–3

[Fig. 4. Atretic follicles in the ovary of *Salamandrella keyserlingii*: *A, B* – parts of the early atretic follicles; *C, D* – parts of the late atretic follicles. Staining:

A, B, D – azan modified; *C* – PAS-method. Scale: 100 μm. Micrographs by VV Yartsev.

POp – part of the ooplasm, NFC – nucleus of the follicle cell,

P – pigment, other abbreviations as in Figs. 1–3]

Оогонии отмечены практически во всех исследованных яичниках. У самок перед икрометанием в яичнике преобладают зрелые и превителлогенетические фолликулы. В яичнике самки во время овуляции наряду с данными фолликулами появляются и постовуляционные. После икрометания в яичниках преобладают превителлогенетические и постовуляционные фолликулы, присутствуют также единичные атретические фолликулы. У самок перед икрометанием, во время овуляции и сразу после икрометания выявлены ооциты с относительно небольшим количеством желтка, который, в отличие от остальных ранних вителлогенетических ооцитов, распределён по клетке дисперсно (см. рис. 1, *G*), а не в виде полосы по периферии клетки (рис. 1, *D*). У некоторых из таких ооцитов *zona pellucida* была выражена, у других – отсутствовала. Самки с мелкими лентовидными яичниками

и тонкими яйцеводами имели только превителлогенетические фолликулы. Учитывая небольшую длину тела самок данной группы, использованных в данной работе (см. таблицу), они могут быть отнесены к неполовозрелым. У одной из них, отловленной в середине июля ($L = 53,4$ мм), отмечено активное формирование мелких превителлогенетических фолликулов. У самок с признаками созревания половой системы также присутствуют превителлогенетические фолликулы, а количество вителлогенетических фолликулов увеличивается в ходе созревания. У некоторых из них присутствовали и атретические фолликулы.

Микроструктура яичника и его элементов у *S. keyserlingii* сходна с таковой других хвостатых земноводных [13, 14]. Строение атретических фолликулов *Andrias davidianus* [15], лягушек – *Rana temporaria*, *Pelophylax lessonae* и *P. ridibundus* [16] также соответствует таковой сибирского углозуба. Наиболее обособлены яйцеживородящие виды хвостатых земноводных, у которых постовуляционные фолликулы превращаются в жёлтые тела, обеспечивающие беременность [17, 18].

Существуют различные схемы периодизации оогенеза у земноводных. Наиболее широко распространённой является схема, основанная на данных по *Xenopus laevis* [19]. Она включает 6 стадий оогенеза, объединяемых в 3 основных периода: превителлогенез (стадии 1–2), вителлогенез (стадии 3–5) и поствителлогенез (стадия 6). При этом оогонии не включены в данную схему. В других работах по бесхвостым земноводным выделяют до 7 стадий созревания ооцитов [16]. Аналогичные различия встречаются и для хвостатых земноводных. Так, периодизация оогенеза видов рода *Ambystoma* [14] также исключает рассмотрение оогониев и включает 2 превителлогенетические стадии, 3 стадии вителлогенеза и одну стадию созревания (предовуляционный ооцит). Р. Шарон и соавт. [20] определили 6 стадий оогенеза у *Salamandra salamandra*, в которые включены и оогонии. Опираясь на данные схемы, нами выделено 6 стадий оогенеза *S. keyserlingii*: оогонии и 5 стадий для растущих ооцитов I порядка на стадии диплотены. Такая периодизация основана на наиболее заметных качественных и количественных изменениях ооцитов, *zona pellucida* и фолликулярных клеток сибирского углозуба. Стадия 1, период превителлогенетического роста, может быть в свою очередь разделена на две подстадии – ранних и поздних превителлогенетических фолликулов, как у других земноводных [14, 16, 19, 20].

В момент активного накопления желтка фолликулы яичника *Hynobius nigrescens*, *H. hidamontanus* [8], а также *S. keyserlingii* [3, 7, наши данные] приобретают зелёную окраску мятного оттенка. Зелёный цвет желточных гранул описан у некоторых древесных лягушек, в то время как у большинства других земноводных желток желтовато-кремового цвета [21]. М. Хасуми [8] предположил, что зелёная окраска желтка может выполнять функцию маскировки при развитии в водоёмах, богатых зелёными водорослями.

Созревшие фолликулы *H. nigrescens* имеют тёмно-коричневый цвет [8], а *S. keyserlingii* – чёрный [3, 7, наши данные]. Тёмные тона формируются в результате отложения меланина по периферии яйца. Для другого представителя данного семейства – *Batrachuperus pinchonii* – показано, что в ходе оогенеза не происходит накопления меланина в ооцитах [22]. В связи с этим у видов рода *Batrachuperus*, размножающихся в ручьях, икринки окрашены в желтоватые тона [23]. Светлая окраска икринок отмечена и у других реофильных углозубых – *Ranodon sibiricus* [1], *Onychodactylus japonicus* [24]. Отсутствие меланина в яйцах характерно для многих земноводных, размножающихся в проточной воде [25]. Отсутствие меланина в яйце иногда встречается и у *S. keyserlingii*, такие эмбрионы окрашены в светлые тона (кладки из г. Екатеринбурга, Средний Урал: персональное сообщение В.Л. Вершинина).

Наличие вителлогенетических фолликулов с небольшим количеством рассеянного по цитоплазме желтка у самок до икрометания и сразу после него указывает на их формирование в ходе вителлогенеза в предшествующий отлову период активности. Такие фолликулы не описаны в ходе оогенеза у других углозубых – *H. nigrescens* [8] и *B. pinchonii* [22]. Причины формирования и дальнейшая судьба таких фолликулов неизвестны. В них может возобновиться накопление желтка в ходе следующего периода вителлогенеза, или они могут подвергнуться атрезии.

Заключение

В оогенезе *S. keyserlingii* могут быть выделены 6 основных стадий на основе состояния ядра, *zona pellucida*, наличия желточных гранул и степени заполнения ими цитоплазмы ооцита, количеству меланиновых зёрен в кортикальном слое ооцита. Накопление меланина в овоцитах в ходе их созревания – особенность оогенеза сибирского углозуба, общая с другими представителями семейства Hynobiidae, характеризующимися лимнофильным типом размножения.

Авторы благодарны В.Л. Вершинину (г. Екатеринбург) за дополнительную информацию об изменчивости окраски яиц сибирского углозуба.

Литература

1. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. Второе издание, переработанное. М. : Товарищество научных изданий КМК, 2012. 370 с.
2. Raffaëlli J. Les Urodèles du monde. 2e édition. Penclen Édition, 2013. 472 p.
3. Ярцев В.В. Репродуктивная биология хвостатых земноводных рода *Salamandrella* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae) : дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2014. 253 с.
4. Савельев С.В., Куранова В.Н., Бесова Н.В. Размножение сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* // Зоологический журнал. 1993. Т. 72, вып. 8. С. 59–69.

5. Kuranova V.N., Saveliev S.V. Reproductive cycles of the Siberian newt *Salamandrella keyserlingii* Dybowsky, 1870 // *Herpetologia Bonnensis* II. Proceeding of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica. 2006. P. 73–76.
6. Ярцев В.В., Куранова В.Н. Состояние половой системы сибирского углозуба *Salamandrella keyserlingii* Dybowsky, 1870 на разных этапах репродуктивного цикла // *Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии : тезисы докл. I Всерос. молодеж. науч. конф., посвящ. 125-летию биол. иссл-й ТГУ. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2010. С. 54.*
7. Yartsev V.V., Kuranova V.N. Seasonal dynamics of male and female reproductive systems in the Siberian Salamander, *Salamandrella keyselingii* (Caudata, Hynobiidae) // *Asian Herpetological Research*. 2015. Vol. 6, № 3. P. 169–183.
8. Hasumi M. Seasonal fluctuations of female reproductive organs in the salamander *Hynobius nigrescens* // *Herpetologica*. 1996. Vol. 52, № 4. P. 598–605.
9. Гаранин В.И., Панченко И.М. Методы изучения амфибий в заповедниках // *Амфибии и рептилии заповедных территорий. М., 1987. С. 8–25.*
10. Басарукин А.М., Боркин Л.Я. Распространение, экология и морфологическая изменчивость сибирского углозуба, *Hynobius keyserlingii*, на острове Сахалин // *Экология и фаунистика амфибий и рептилий СССР и сопредельных стран : Тр. Зоол. ин-та Академии наук СССР (Ленинград). 1984. Т. 124. С. 12–54.*
11. Exbrayat J.M. Classical methods of visualization // *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization* / ed. by J. M. Exbrayat. London ; New York : CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2013. P. 3–58.
12. Exbrayat J.M. Histochemical Methods // *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization* / ed. by J. M. Exbrayat. London ; New York : CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2013. P. 59–138.
13. Delsol M. Appareil génital femelle. Anatomie–histologie. Cycle annuel et déterminisme du cycle // *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. T. XIV, Fasc. 1A. / ed. par P.P. Grassé, M. Delsol. Paris : Masson, 1995. P. 1231–1264.*
14. Uribe M.C.A. The ovary and oogenesis // *Reproductive biology and phylogeny of Urodela* / ed. by D.M. Sever. Science Publishers, 2003. P. 135–142.
15. Zhang Y., Jia L., Wang H. Microstructure and ultrastructure of atretic follicles in the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* // *Acta Zool. Sinica*. 2004. Vol. 50, № 4. P. 615–621.
16. Ogielska M., Rozenblut B., Augustyn'ska R., Kotusz A. Degeneration of germline cells in amphibian ovary // *Acta Zoologica*. 2010. Vol. 91, № 3. P. 319–327.
17. Joly J. La reproduction de la Salamandre terrestre (*Salamandra salamandra* L.) // *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Vol. 14, Fasc. 1B: Batraciens / ed. par P.P. Grassé, M. Delsol. Paris : Masson, 1986. P. 471–486.*
18. Vilter V. La reproduction de la Salamandre noire (*Salamandra atra*) // *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Vol. 14, Fasc. 1B: Batraciens / ed. par P.P. Grassé, M. Delsol. Paris : Masson, 1986. P. 487–495.*
19. Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // *J. Morph.* 1972. Vol. 136, № 2. P. 153–179.
20. Sharon R., Degani G., Warburg M.R. Oogenesis and the ovarian cycle in *Salamandra salamandra infraimmaculata* Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in fringe areas of the taxon's distribution // *J. Morph.* 1997. Vol. 231, № 2. P. 149–160.
21. Salthe S.N., Mechem J.S. Reproductive and courtship pattern // *Physiology of the Amphibian* / ed. by B.L. Lofts. N. Y. : Academic Press, 1974. P. 309–521.
22. Jia L., Zhang Y. Microstructure and ultrastructure of ovarian follicular cells in little salamander, *Batrachuperus pinchonii* // *Zool. Res.* 2000. Vol. 21, № 5. P. 419–421.

23. Ebrahimi R., Kami H.G., Stöck M. First description of egg sacs and early larval development in hynobiid salamanders (Urodela, Hynobiidae, *Batrachuperus*) from North-Eastern Iran // Asiatic Herpetol. Res. 2004. Vol. 10. P. 168–175.
24. Akita Y. Notes on the egg-laying site of *Onychodactylus japonicus* on Mt. Hodatsu // Japanese Journal of Herpetology. 1982. Vol. 9, № 4. P. 111–117.
25. Duellman W.E., Trueb L. Biology of Amphibians. N. Y. : McGraw-Hill, 1986. 670 p.

Поступила 19.09.2015 г.; повторно 10.10.2015 г.; принята 15.10.2015 г.

Авторский коллектив:

Ярцев Вадим Вадимович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры зоологии позвоночных и экологии; н.с. лаборатории мониторинга биоразнообразия Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск, Россия).

E-mail: vadim_yartsev@mail.ru

Экброя Жан-Мари – д-р наук (биология), профессор, зав. лабораторией общей биологии Католического университета Лиона, профессор; зав. лабораторией сравнительной репродукции и развития Практической школы высших исследований (г. Лион, Франция).

E-mail: jmexbrayat@univ-catholyon.fr; jean-marie.exbrayat@ephe.sorbonne.fr

Куранова Валентина Николаевна – канд. биол. наук, доцент кафедры зоологии позвоночных и экологии; с.н.с. лаборатории мониторинга биоразнообразия Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск, Россия).

E-mail: kuranova49@mail.ru

Yartsev VV, Exbrayat JM, Kuranova VN. Oogenesis in the Siberian salamander, *Salamandrella keyserlingii* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;4(32):127-144. doi: 10.17223/19988591/32/7. In Russian, English summary

Vadim V. Yartsev¹, Jean-Marie Exbrayat², Valentina N. Kuranova¹

¹ Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

² Université Catholique de Lyon, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Lyon, France

**Oogenesis in the Siberian salamander, *Salamandrella keyserlingii*
(Amphibia: Caudata, Hynobiidae)**

Previous studies have described the possibility of biennial reproductive cycle in females of *Salamandrella keyserlingii*. To verify this statement, the detailed observation the females captured throughout the year or more and description of oogenic stages are necessary. In this study, we described all stages of oogenesis from oogonia to mature oocytes, also postovulatory and atretic follicles in *S. keyserlingii*. We studied females with a various reproductive system state captured in May-August 2005, 2006, and 2013 in the suburbs of Tomsk (the southeast of Western Siberia, Russia). We conducted histological and histochemical examinations of the ovaries using the Mayer's hematoxylin-eosin, modified azan, alcian blue (pH = 0.5 and 2.5), and PAS staining methods. We divided the oogenesis into 6 stages. Oogonia (stage 1) are the smallest of oogenic cells (Mean diameter: Mean, Range; 20.9 μ m, 14.2-26.4, n = 10), located singly or in groups in the ovarian wall. The stage 2 is previtellogenic oocytes (230.8 μ m, 93.7-372.9, n = 10). These cells did not have the yolk and zona pellucida. At stage 2, some regions of ooplasm are stained with alcian blue and PAS positive. At stage 3 (494.7 μ m, 389.4-598.6, n = 10), there are yolk granules in the peripheral parts of oocytes. The zona pellucida is visible and PAS positive. Females before spawning (gravid), during ovulation, and just after

breeding had early vitellogenic follicles with dispersal distribution of yolk granules in the ooplasm. At stage 4 (634.5 μm , 527.8-711.7, $n = 10$), oocytes have two parts in the ooplasm: large peripheral region rich yolk granules and central region without them and contained the nucleus. Oocytes of stage 5 (875.3 μm , 647.6-1163.4, $n = 10$) are rich yolk granules. In the submembranous zone of these cells, numerous small melanin granules are present. Stage 6 is mature oocytes (1534.3 μm , 1258.6-1696.5, $n = 10$). These cells were mesolecithal and telolecithal. Early postovulatory follicles are vascularized, have a thick wall. Inside of these follicles, there are follicle cells and numerous macrophages. Late postovulatory follicles are smaller. Follicle cells inside of them have several signs of degeneration (e.g., karyorhexis, hyperchromia). In several females after spawning and during maturation of the ovary, we detected atretic follicles. During atresia, follicle cells entered into the damaged oocyte. Presence of yolk granules in several atretic follicles is indicated, that vitellogenic follicles were involved into the process. The late atretic follicles contain the pigment or follicular cells having adipocyte-like morphology.

Acknowledgments: This work was supported by the Tomsk State University Competitiveness Improvement Program.

We thank Dr. VL Vershinin (Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences) for supplementary information about the coloration variability of eggs in *Salamandrella keyserlingii*.

The article contains 4 Figures, 1 Tables, 25 References.

Key words: Hynobiidae; ovary; oogonium; oocyte; ovarian follicle; atretic follicle; postovulatory follicle

References

1. Kuz'min SL. Zemnovodnye byvshego SSSR [Amphibians of the former USSR]. 2nd edition, corrected. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ.; 2012. 370 p. In Russian
2. Raffaëlli J. Les Urodèles du monde. 2^e édition. Condé-sur-Noireau, France: Penclen Édition; 2013. 472 p. In France
3. Yartsev VV. Reproductivnaya biologiya khvostatykh zemnovodnykh roda *Salamandrella* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae) [Reproductive biology of salamanders of genus *Salamandrella* (Amphibia: Caudata, Hynobiidae). CandSci. Dissertation, Biology]. Tomsk: Tomsk State University; 2014. 253 p. In Russian
4. Savel'ev SV, Kuranova VN, Besova NV. Reproduction of Siberian salamander *Salamandrella keyserlingii*. *Zoologicheskii zhurnal*. 1993;72(8):59-69. In Russian, English summary
5. Kuranova VN, Saveliev SV. Reproductive cycles of the Siberian newt *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870. In: *Herpetologia Bonnensis II*. Proc. of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica 27 September - 2 October 2005 Bonn, Germany. Vences M, Kohler J, Ziegler T, Bohme W, editors. 2006. pp. 73-76.
6. Yartsev VV, Kuranova VN. Sostoyanie polovoy sistemy sibirskogo uglozuba *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 na raznykh etapakh reproduktivnogo tsikla [State of male and female reproductive systems of *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 at different stages of reproductive cycles]. In: *Fundamental'nye i prikladnye aspekty sovremennoy biologii*. Tezisy dokl. I Vseross. molodezh. nauch. konf., posvyashchennaya 125 letiyu biol. issl-y TGU [Fundamental and applied aspects of Current Biology. Proc. of the 1st Russian Conference of Young Scientists dedicated to the 125th Anniversary of Biological Research at Tomsk State University]. Tomsk: Tomsk State University Publishing House; 2010. p. 54. In Russian

7. Yartsev VV, Kuranova VN. Seasonal dynamics of male and female reproductive systems in the Siberian Salamander, *Salamandrella keyselingii* (Caudata, Hynobiidae). *Asian Herpetol. Res.* 2015;6(3):169-183. doi: [10.16373/j.cnki.ahr.140033](https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.140033)
8. Hasumi M. Seasonal fluctuations of female reproductive organs in the salamander *Hynobius nigrescens*. *Herpetologica.* 1996;52(4):598-605.
9. Garanin VI, Panchenko IM. Metody izucheniya amfibiyy v zapovednikakh [Methods to study amphibians in reserves]. In: *Amfibii i reptilii zapovednykh territoriy*. Sbornik nauchnykh trudov TsNII Glavokhoty RSFSR [Amphibians and Reptiles of Reserve Territories. Proceedings]. Moscow; 1987. pp. 8-25. In Russian
10. Basarukin AM, Borkin LJ. Distribution, ecology and morphological variability of the Siberian salamander, *Hynobius keyserlingii*, of the Sakhalin Island. In: *Ecology and Faunistics of Amphibians and Reptiles of the USSR and Adjacent Countries*. Proceedings of the Zoological Institute. Vol. 124. Borkin LJ, editor. Leningrad: USSR Academy of Sciences; 1984. pp. 12-54. In Russian
11. Exbrayat JM. Classical methods of visualization. In: *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization*. Exbrayat JM, editor. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor and Francis Group; 2013. pp. 3-58.
12. Exbrayat JM. Histochemical Methods. In: *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization*. Exbrayat JM, editor. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor and Francis Group; 2013. pp. 59-138.
13. Delsol M. Appareil génital femelle. Anatomie-histologie. Cycle annuel et déterminisme du cycle. In: *Traité de zoologie : anatomie, systématique, biologie. T. XIV, Fasc. 1A*. Grassé PP, Delsol M, editors. Paris: Masson; 1995. pp. 1231-1264. In France
14. Uribe MCA. The ovary and oogenesis. In: *Reproductive biology and phylogeny of Urodela*. Vol. 1. 1st edition. Sever DM, editor. USA: Science Publishers; 2003. pp. 135-142.
15. Zhang Y, Jia L, Wang H. Microstructure and ultrastructure of atretic follicles in the Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. *Acta Zool. Sinica.* 2004;50(4):615-621.
16. Ogielska M, Rozenblut B, Augustyn'ska R, Kotusz A. Degeneration of germline cells in amphibian ovary. *Acta Zoologica.* 2010;91(3):319-327. doi: [10.1111/j.1463-6395.2009.00411.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2009.00411.x)
17. Joly J. La reproduction de la Salamandre terrestre (*Salamandra salamandra* L.). In: *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie*. Vol. 14. Fasc. 1B: Batraciens. Grassé PP, Delsol M, editors. Paris: Masson; 1986. pp. 471-486. In France
18. Vilter V. La reproduction de la Salamandre noire (*Salamandra atra*). In: *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie*. Vol. 14, Fasc. 1B: Batraciens. Grassé PP, Delsol M, editors. Paris: Masson; 1986. pp. 487-495. In France
19. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* 1972;136(2):153-179. doi: [10.1002/jmor.1051360203](https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203)
20. Sharon R, Degani G, Warburg MR. Oogenesis and the ovarian cycle in *Salamandra salamandra inframaculata* Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in fringe areas of the taxon's distribution. *J. Morph.* 1997;231(2):149-160. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199702\)231:2<149::AID-JMOR4>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199702)231:2<149::AID-JMOR4>3.0.CO;2-9)
21. Salthe SN, Mecham JS. Reproductive and courtship pattern. In: *Physiology of the Amphibian*. Lofts BL, editor. New York: Academic Press; 1974. pp. 309-521.
22. Jia L, Zhang Y. Microstructure and ultrastructure of ovarian follicular cells in little salamander, *Batrachuperus pinchonii*. *Zool. Res.* 2000;21(5):419-421.
23. Ebrahimi R, Kami HG, Stöck M. First description of egg sacs and early larval development in hynobiid salamanders (Urodela, Hynobiidae, *Batrachuperus*) from North-Eastern Iran. *Asiatic Herpetol. Res.* 2004;10:168-175.

24. Akita Y. Notes on the egg-laying site of *Onychodactylus japonicus* on Mt. Hodatsu. *Japanese Journal of Herpetology*. 1982;9(4):111-117.
25. Duellman WE, Trueb L. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill; 1986. 670 p.

Received 10 September, 2015;

Revised 10 October, 2015;

Accepted 15 October, 2015

Author info:

Yartsev Vadim V, Cand. Sci. (Biol.), Senior Lecturer, Department of Vertebrate Zoology and Ecology; Researcher, Laboratory of Biodiversity Monitoring, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Pr., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: vadim_yartsev@mail.ru

Exbrayat Jean-Marie, Ph.D. (Animal Biology), Dr. Sci. (Natural Sciences), Professor, Laboratory of General Biology, Catholic University of Lyon, Directeur d'Etudes; Professor, Laboratory of Comparative Reproduction and Development, Ecole Pratique des Hautes Etudes (Lyon, France).

E-mail: jmexbrayat@univ-catholyon.fr; jean-marie.exbrayat@ephe.sorbonne.fr

Kuranova Valentina N, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Vertebrate Zoology and Ecology; Senior Researcher, Laboratory of Biodiversity Monitoring, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Pr., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: kuranova49@mail.ru