



## Промысловые виды и их биология

# К разработке техники термического маркирования отолитов личинок камбалы-калкана

Е.Б. Фурсенко, И.В. Бурлаченко

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»), проезд Окружной, 19, Москва, 105187  
E-mail: veta-08@inbox.ru

**Целью работы** являлась оценка применимости метода термического маркирования отолитов для личинок и ранней молоди камбалы-калкана, полученных в промышленных условиях для пополнения природных популяций.

**Используемые методы:** для мечения в экспериментальных условиях трёх групп личинок разного возраста использовали минимум три последовательных цикла резкого снижения температуры воды в диапазоне 3,7–7,0 °С, с последующим выравниванием температуры до благоприятных для личинок значений. Для оценки эффективности проведённого маркирования проводили фиксацию личинок, затем извлекали отолиты (сагитты и лапиллюсы), шлифовали вручную на шлифовальных дисках Buehler и просматривали на тринокулярном микроскопе Leica DMLS для обнаружения последовательного ряда колец метки.

**Новизна:** термическое маркирование отолитов личинок камбалообразных рыб было проведено впервые.

**Результат:** показана возможность термического маркирования отолитов личинок и ранней молоди камбалы-калкана. Установлено, что наиболее чёткие метки на отолитах можно получить при мечении на завершающих стадиях метаморфоза (в возрасте 45–47 сут.), после перехода личинок к донному образу жизни. Оптимальный температурный градиент составляет 5–6 °С при продолжительности воздействия низкой температуры в течение 5 часов и проведении не менее трёх последовательных циклов маркирования.

**Практическая значимость:** результаты исследования могут быть использованы для массового маркирования молоди камбалы-калкана в целях определения вклада искусственного воспроизводства в пополнение природных популяций, а также при разработке методов маркирования рыб – объектов искусственного воспроизводства различной систематической принадлежности.

**Ключевые слова:** отолиты, камбала-калкан *Scophthalmus maeoticus*, мечение, маркирование, маркирование отолитов, искусственное воспроизводство.

## To the development of the thermal marking technique of otoliths turbot larvae

Elizaveta B. Fursenko, Irina V. Burlachenko

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography («VNIRO»), 19, Okruzhnoy proezd, Moscow, 105187, Russia

**The aim** of the study was to determine the possibility of thermal marking of larvae and juvenile turbot otoliths used to identify factory juveniles produced to recruitment natural populations.

**Methods used:** three consecutive cycles of a sharp decrease in water temperature in the range of 3.7–7.0 °C were used and also recovering the water temperature to optimal for thermal marking under experimental conditions for three groups of different ages larvae. To assess the marking results, larvae were fixed, then otoliths (sagittae and lapilli) were extracted, ground manually on Buehler grinding discs and viewed on a Leica DMLS trinocular microscope.

**Novelty:** thermal marking of otoliths of flounder fish larvae was carried out for the first time.

**Result:** The possibility of thermal marking of larvae and early juveniles otoliths of turbot is shown. It was found that the best marks on otoliths can be obtained when marking at the final stages of metamorphosis (at the age of 45–47 days), after the settlement to a bottom. The optimal temperature gradient is 5–6 °C, with a duration of exposure to low temperature for 5 hours, an interval between marking cycles of 5 hours and the use of at least three consecutive marking cycles.

**Practical significance:** The results of the study can be used for mass marking of turbot in order to determine the contribution of artificially reproduced juveniles to the recruitment of natural populations, as well as in the development of methods for marking fish – objects of artificial reproduction of various systematic groups.

**Keywords:** otolith, turbot *Scophthalmus maeoticus*, marking, otolith marking, artificial reproduction.

## ВВЕДЕНИЕ

Камбала-калкан (*Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814)) – важный объект промысла в Азово-Черноморском бассейне. Запасы этого вида находятся на невысоком уровне и подвержены заметным межго-

довым колебаниям под действием неблагоприятных экологических факторов и пресса рыболовства [Попова, Кокос, 1973; Ханайченко, Гиригосов, 2021]. Негативно сказывается на численности вида и отсутствие единого подхода к оценке запасов странами Черно-

морского региона. Тенденций к росту и стабилизации запасов камбалы-калкана не наблюдается [Куманцов, 2013].

Поэтому сохранение и преумножение численности вида остаются актуальными задачами, в том числе с использованием искусственного воспроизводства. Мероприятия по искусственному воспроизводству, помимо непосредственного выпуска молоди в природную среду обитания, требуют также наличия объективной оценки их результативности. В этом аспекте несомненный интерес представляет выбор надёжных методов и проведение мечения выпускаемой молоди. При этом выбранный метод должен быть прост в применении и подходить для массового использования, т. к. при искусственном воспроизводстве количество одновременно выпускаемой молоди может составлять от десятков тысяч до нескольких миллионов особей.

Варианты мечения взрослых особей или крупной молоди представителей отряда камбалообразных (Pleuronectiformes) весьма разнообразны. Применяются как механические метки, закрепляемые на поверхности тела, так и вживляемые, например, под кожу [Bergstad, Folkvord, 1997; Oesau et al., 2013]. Однако эти способы в силу размеров индивидуальных меток и необходимости манипуляций непосредственно с каждой рыбой не подходят для массового мечения личинок или ранней молоди, массой менее 1 г. Для маркирования камбал на ранних стадиях развития с успехом применяли красители. Например, имеются сведения о маркировании икры и двухдневных личинок тюрбо (*Scophthalmus maximus* (L., 1758)) ализарин-комплексом. Ализариновые красители также с успехом применяли для мечения молоди камбалы, выдерживая её 24 ч в растворе [Liu et al., 2009] или вводя красители в корм [Isshiki, Katayama, 2007].

Следует отметить, что исследования, посвящённые мечению молоди рыб природными или синтетическими красителями, зачастую не ставят задачи изучения длительности сохранности меток, поэтому обычно сроки проверки меток не превышают нескольких месяцев после мечения [The use of ..., 2009; Iglesias, Rodriguez-Ojea, 1997; Yang et al., 2016]. Таким образом, нет уверенности в обнаружении метки спустя несколько лет после маркирования. Также важным ограничивающим фактором использования красителей является возможность их естественного выведения из отолитов, уменьшение чёткости таких меток со временем [Bashey, 2004; Campanella et al., 2013] и сложность считывания метки с увеличением возраста рыб [Iglesias, Rodriguez-Ojea, 1997].

Известно, что длительное время (несколько лет) сохраняются метки на отолитах тихоокеанских лососей, маркирование которых проводят в условиях рыбободных заводов в процессе инкубации икры путём осушения или изменения температуры. Метки, полученные в результате этой процедуры, с успехом используются для определения промыслового возврата тихоокеанских лососей [Акиничева, 2006]. Этот способ позволяет пометить большое число особей на самых ранних этапах развития, при этом он не травматичен, технически прост и не требует существенных затрат.

Перечисленные обстоятельства и положительный опыт использования нами метода термического маркирования для личинок щуки, также являющейся объектом искусственного воспроизводства [Фурсенко, 2021] и имеющей, в отличие от лососей, короткий период эмбрионального развития, явились основанием для оценки возможности его применения для камбалы-калкана. В задачи исследования входило определение возраста личинок для проведения мечения, величины градиента температурного воздействия и количества циклов мечения.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальные работы были выполнены в 2020–2021 годах в условиях научно-экспериментальной базы «Заветное» Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО». Личинки для экспериментов были получены от производителей из природных популяций, отловленных в море в период нерестового хода. В разных вариантах опытов использовали личинок в возрасте от 11 до 47 сут. За несколько суток до начала маркирования личинок камбалы-калкана размещали в двух одинаковых аэрируемых бассейнах, объёмом 400 или 600 л каждый, формируя экспериментальные и контрольные группы. В бассейнах с контрольными группами температура воды менялась незначительно в соответствии с суточными колебаниями. В бассейнах с экспериментальными группами в процессе маркирования температуру воды меняли по запланированной схеме, чередуя охлаждение и нагрев. Продолжительность температурного воздействия во всех экспериментах составляла 5 часов, как и интервал между циклами охлаждения. Требуемую температуру поддерживали при помощи холодильников Hailea-HC-2200BN и Hailea-HC-1000BN. Солёность воды в бассейнах во всех сериях опыта составляла 17–19‰.

Все личинки получали корм на протяжении экспериментов и после них. Кормление осуществляли 1–2 раза в сутки, внося смесь живых кормов (зоопланктон, науплии артемии) *ad libitum*. В целях предотвращения

влияния освещения на формирование меток световой режим был постоянным (24 ч). В течение светового дня бассейны находились в условиях естественного освещения, в тёмное время суток они были освещены электрическими лампами. Серии выполненных экспериментов различались по возрасту личинок, температуре содержания и маркирования, количеству циклов мечения. Условия выполнения опытов в ряде случаев корректировали на основании промежуточных результатов, полученных в предыдущих сериях.

На следующие сутки после завершения маркирования личинок в количестве 5–10 экз. отбирали и фиксировали для установления факта образования меток. Далее личинок фиксировали через 7–125 сут. после завершения маркирования. Всех отобранных личинок измеряли, фотографировали и фиксировали в 96%-ном этаноле. Отолиты извлекали, очищали и фиксировали на предметном стекле термопластическим цементом TriPod Wax. Шлифовку проводили вручную, на шлифовальных дисках Buehler различной абразивности. Подготовку и анализ препаратов проводили с помощью бинокулярного микроскопа Olympus SZX-12 и тринокулярного микроскопа Leica DMLS, оборудованного камерой для микроскопов Leica DC 100. Препараты отолитов просматривали и фотографировали при увеличении 200, 400 и 1000. Обработку фотографий проводили в программе Microsoft Power Point. Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Excel, достоверность различий между группами рассчитывали с помощью критерия Стьюдента. О результатах мечения судили на основании визуальной оценки образующихся при температурном воздействии изменений микроструктуры отолитов. Всего было обработано около 430 отолитов (от 85 – для первой серии опытов до 180 – для третьей).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кольцевая микроструктура отолита формируется т. н. суточными кольцами прироста, каждое из которых состоит из двух зон. Одна зона богата кальцием и в проходящем свете выглядит светлым широким кольцом, её называют непосредственно зоной прироста (incremental, L-zones), а тёмную более узкую, богатую органическими составляющими, – прерывистой или разделяющей (discontinuous, D-zones) [Edeyer et al., 2000]. Мечение отолитов основано на целенаправленном изменении микроструктуры отолита (под действием, например, температуры) для дальнейшего выявления такой метки. Для определения оптимальных условий мечения (возраст личинок или молоди, величина и значение температурного градиента, дли-

тельность температурного воздействия) был проведён предварительный анализ данных об особенностях биологии и микроструктуры отолитов камбалообразных рыб.

В частности, известно, что серьёзные перестройки организма рыб, такие как переход к экзогенному питанию, существенные изменения рациона или биотических условий жизни (солёности, температуры воды, освещённости) приводят к изменению рисунка на отолитах рыб и появлению колец более ярких, чем суточные (например кольца пигментации глаз и выклева) [Walker, McCormick, 2004; Wang, Eckmann, 1992; Eckmann, Rey, 1987; Victor, 1982]. В этой связи при разработке схем маркирования личинок камбалы-калкана мы учли необходимость обеспечения чёткой дифференцировки формируемых меток на фоне кольцевой микроструктуры отолитов. Поэтому температурное воздействие применяли от трёх до пяти раз через равные промежутки времени. Кроме того, из схемы маркирования были исключены этапы начала кормления (3–4-е сутки), смены кормовых объектов – переход от кормления коловратками к использованию науплиев артемии (7–9-е сутки), начала метаморфоза (14–17-е сутки), начала завершения метаморфоза и перехода к донному образу жизни (28–35-е сутки). Следует также отметить, что по данным О.Н. Масловой [2013] для этих же периодов характерны и основные пики смертности личинок, т. е. любое дополнительное воздействие в подобные критические периоды могло спровоцировать дополнительную гибель.

При выборе градиента температурного воздействия мы исходили из того, что перепад температуры при маркировании должен быть достаточным, чтобы оставить яркие отметки на отолитах, и при этом не выходить за пределы естественной термотолерантности объекта, а также не приводить к повышенной смертности. Принимая во внимание тот факт, что колебания оптимальных значений температуры для разных стадий развития личинок камбалы-калкана составляет 4–6 °С [Маслова, 2013; Ханайченко, Гиригосов, 2021], температурный градиент для термомечения был определён в диапазоне 4–7 °С. В обобщённом виде возраст личинок, выбранный для мечения, и условия температурного воздействия, представлены в таблице.

**Маркирование в возрасте 11 сут.** В первой серии опытов маркирование личинок, перешедших на активное питание, проводили в возрасте 11 сут. За трое суток до начала мечения личинки были акклиматизированы к условиям опыта – пересажены в экспериментальные аэрируемые бассейны объёмом 0,4 м<sup>3</sup>. В каждый бассейн поместили по 300 личинок.

Таблица. Основные параметры термического маркирования камбалы-калкана

Table. The main parameters of thermal marking experiments of turbot

Серия опыта №	Возраст мечения, сут.	Градиент, °С	Количество циклов мечения	Продолжительность воздействия, ч
1	11	4,6–5,0	3	5
2	22	3,7–5,7	5	5
3	43–47	5,0–7,0	4	5

При проведении маркирования температура воды в контрольном бассейне колебалась в пределах 13,8–15,8 °С. В экспериментальном бассейне процесс охлаждения воды занимал около 60 минут, а нагрева – около 30. Были проведены три цикла температурного воздействия по 5 часов каждое (включая время охлаждения). Температурные кривые в экспериментальном и контрольном бассейнах приведены на рис. 1.

Картина, полученная по результатам опыта, свидетельствовала о том, что для личинок возраста 11 сут. пересадка в экспериментальные бассейны явилась сильным стрессовым фактором. Личинки после пересадки перестали питаться, питание не возобновилось и во время и после маркирования. По этим причинам выживаемость личинок после завершения мечения составила 5% в экспериментальной группе и около 8% – в контрольной. Кроме того, выжившие личинки были значительно ослаблены.

После завершения маркирования общая длина личинок контрольной группы значительно превышала длину личинок экспериментальной группы –

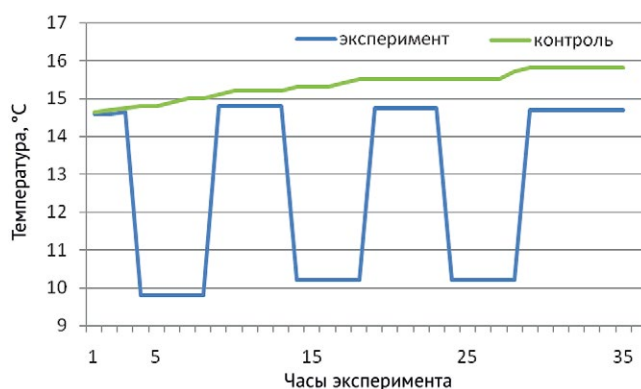


Рис. 1. Схема термического воздействия при маркировании личинок камбалы-калкана в возрасте 11–12 сут.

Fig. 1. The scheme of thermal influence during marking of turbot larvae at the age of about 11–12 days

$8,1 \pm 0,374$  и  $6,4 \pm 0,375$  мм, соответственно. Разница в общей средней длине между группами была достоверна (уровень значимости 0,01). Это было обусловлено понижением температуры воды во время мечения в экспериментальном бассейне.

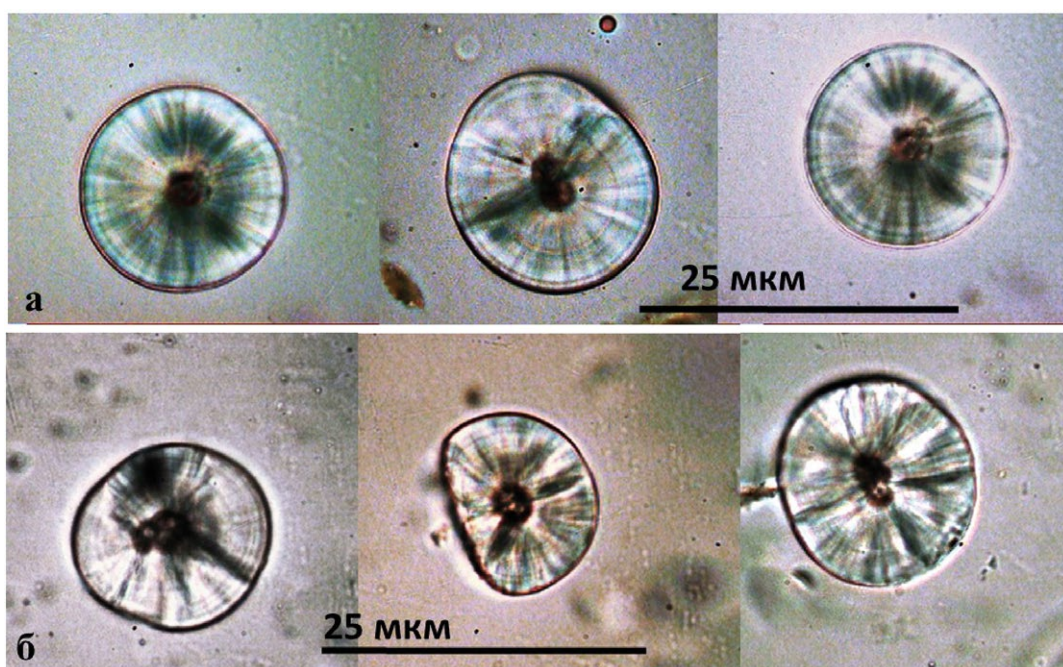


Рис. 2. Отолиты личинок, помеченных в возрасте 11 сут., 1000× а – эксперимент; б – контроль

Fig. 2. Otoliths of turbot marking at the age of about 11 days experimental group (a) and control group (b), 1000×



Анализ отоликов личинок из обоих бассейнов не выявил однозначных различий между группами. Сложность оценки была, вероятно, обусловлена малым размером отоликов и слабой видимостью микроструктуры. Её кольца были заметны только на максимальном увеличении в 1000 раз (рис. 2). При этом значительных отличий в характере микроструктуры отоликов личинок экспериментальной группы от личинок контрольной группы выявлено не было.

Ожидаемая серия из трёх сближенных колец, которая должна была сформироваться по периферии отоликов в результате температурного воздействия отсутствовала. Видимые на фотографиях яркие следы в микроструктуре отоликов, скорее всего, были сформированы в результате таких событий как начало внешнего питания и пересадка в экспериментальные бассейны, а не в результате маркирования. Свидетельством этого является тот факт, что сходные кольца сформировались на отоликах личинок обеих групп.

Таким образом, попытка маркирования личинок камбалы-калкана в возрасте 11 сут. была неудачной. Ключевыми отрицательными факторами здесь явились высокая чувствительность личинок к стрессовым воздействиям, связанным с пересадкой, изменением условий содержания и непосредственно самим термическим воздействием. Также очевидно, что работа с отоликами личинок этой возрастной группы была более продолжительной и трудоемкой.

**Маркирование в возрасте 22 сут.** Во второй серии опыта для маркирования использовали личинок в возрасте 22 сут. В два бассейна, объемом по 0,6 м<sup>3</sup> каждый, было помещено по 60 личинок. В этом варианте мечения процесс охлаждения воды в экспериментальном бассейне занимал 60–90 мин., а нагрева – около 30. В отличие от первой серии опытов температура воды в бассейнах была подвержена более заметным суточным колебаниям. Это было связано с размещением бассейнов вне помещения, под навесом. Температура воды в бассейне с контрольной группой во время мечения составляла 18,2–19,8 °С. В связи с более высокой температурой воздуха процесс охлаждения воды в экспериментальном бассейне был более длительным. Для получения четкого ряда синхронных меток было увеличено количество циклов маркирования. В этой серии опыта использовали пятикратное температурное воздействие путём охлаждения воды в бассейне. Величина и продолжительность температурного воздействия на экспериментальный бассейн, а также температурная кривая в контрольном бассейне приведены на рис. 3.

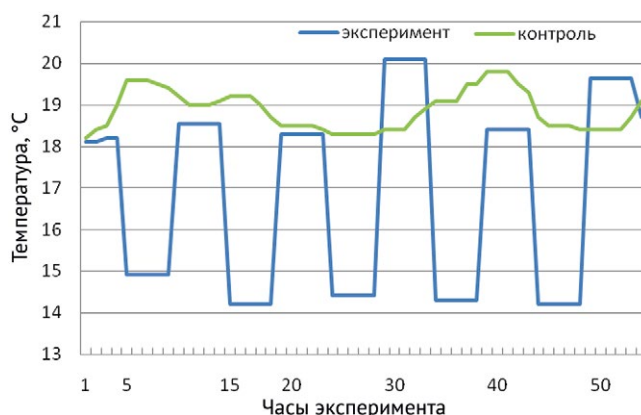


Рис. 3. Схема термического воздействия при маркировании личинок камбалы-калкана в возрасте 22 сут.

Fig. 3. The scheme of thermal influence during marking of turbot larvae at the age of about 22 days

Для предварительной оценки результатов опыта пробы личинок отобрали на следующий день после завершения маркирования (по 5 экз. из экспериментальной и контрольной групп). Выращивание оставшихся личинок было продолжено с целью наблюдения за сохранностью меток.

Как и в первой серии опыта, сразу после завершения маркирования, молодь экспериментальной группы несколько уступала по размерам молоди контрольной группы. Максимальная длина личинок в обеих группах составляла 15,0 мм, максимальная высота – 11,0 мм в контрольной группе, 9,6 мм в экспериментальной. Однако различия между группами не были достоверны из-за малых размеров выборок.

При изучении отоликов личинок камбалы-калкана, помеченных на 22 сут., меток обнаружено не было. Микроструктура их отоликов слабо отличалась от таковой у личинок контрольной группы. Такие результаты могут быть связаны с прекращением питания личинок сразу после пересадки, вызвавшей стресс у личинок как экспериментальной, так и контрольной групп. Известно, что при голодании яркость и ширина суточных колец может уменьшаться, такое явление отмечено для разных видов рыб [Сатрана, 1983]. Свидетельством этого могут быть также менее выраженные суточные кольца по краям отоликов. На фоне общей микроструктуры периферия выглядит чистой и светлой, свободной от ярких образований как в контрольной, так и в экспериментальной группах (рис. 4).

По мере роста молоди и соответственно отоликов в микроструктуре происходили изменения. Несмотря на то, что в той области, где должны располагаться метки на отоликах личинок (область отмечена линией) присутствуют более яркие кольца (рис. 5), их невозможно с полной уверенностью идентифицировать как

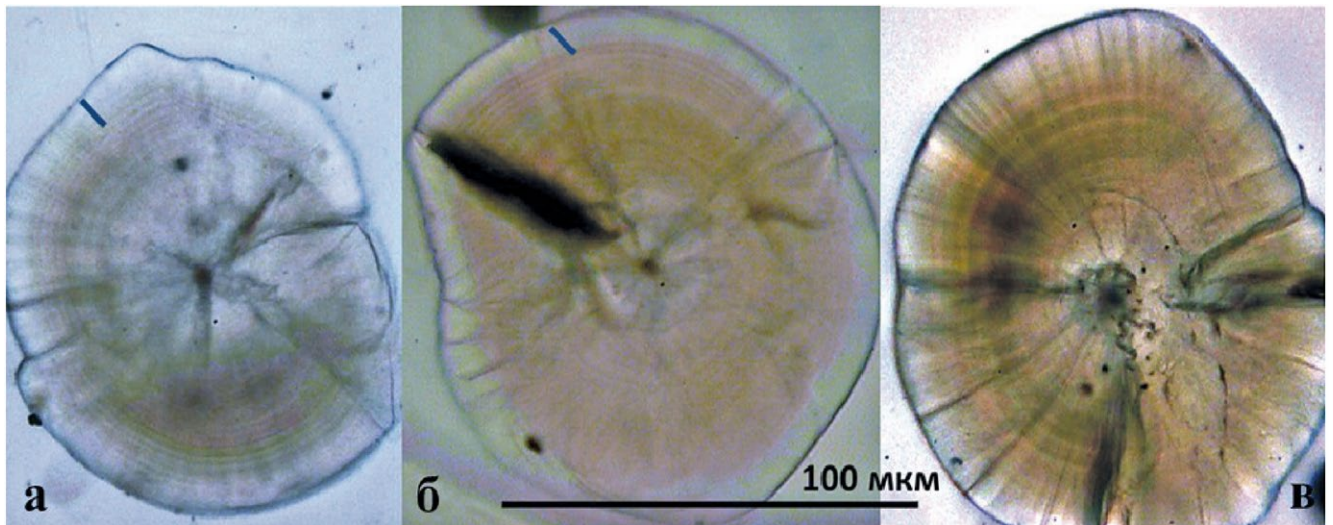


Рис. 4. Сагитты личинок, помеченных в возрасте 22 сут. (1 сут. после мечения), 400×: а, б – эксперимент; в – контроль; — — область нахождения метки

Fig. 4. Sagitta of larvae marking at the age of about 22 days (1 day after marking) experimental group (a) and control group (б), 400× (the area where the mark should be located indicated by the line)

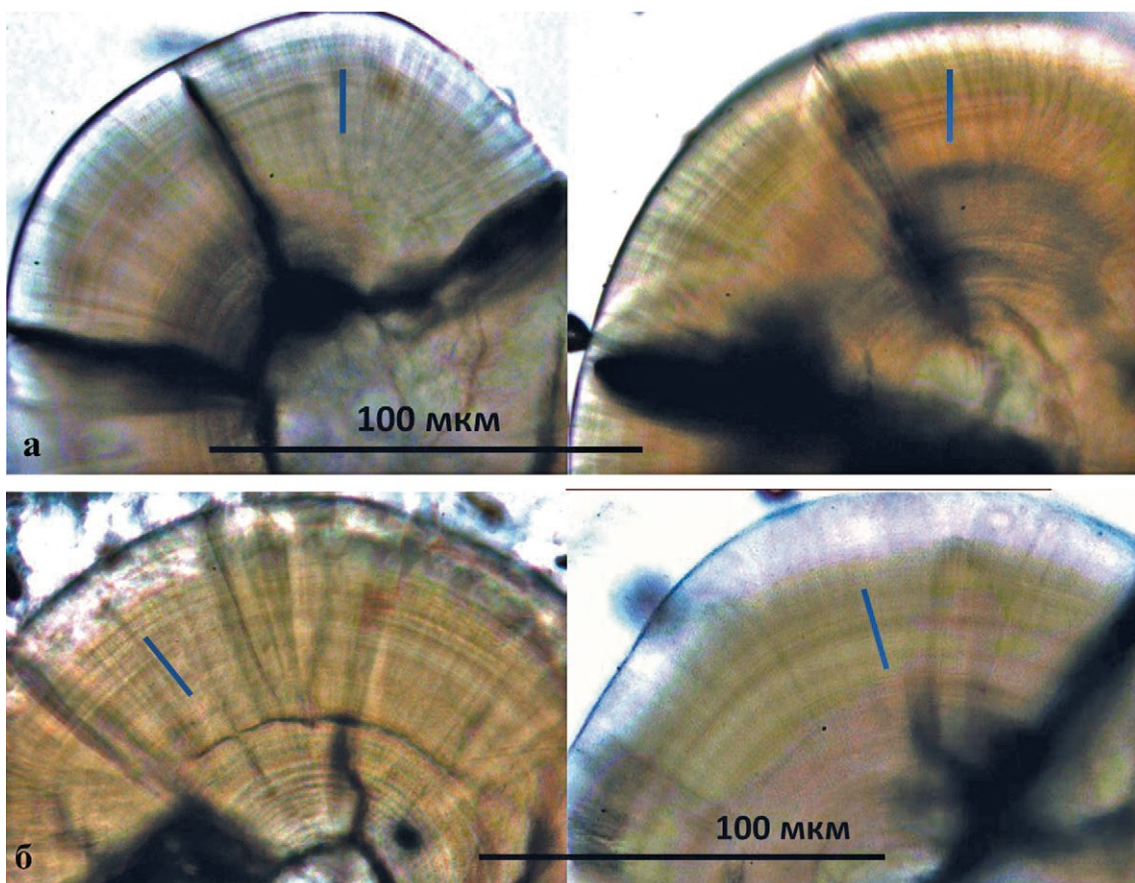


Рис. 5. Сагитты личинок, помеченных в возрасте 22 сут., 400×: а – эксперимент через 7 сут. после маркирования; б – контроль через 15 сут. после маркирования; — — область нахождения метки

Fig. 5. Sagitta of larvae marking at the age of about 22 days: experimental group 7 days after marking (a) and control group 15 days after marking (б), 400× (the area where the mark should be located indicated by the line)



результаты термического маркирования. Запланированной структуры из 5 ярких колец на отолитах молодежи экспериментальной группы обнаружено не было. При этом для идентификации метки были просмотрены отолиты от 21 особи из экспериментальной группы. Возможно, не все циклы мечения оставили следы на общей кольцевой структуре отолитов.

Причины отсутствия чётко выраженной метки на отолитах молодежи экспериментальной группы могут быть связаны со стрессом при пересадке и, как следствие, временным прекращением питания личинок. Это в большей степени, чем температурное воздействие, могло сказаться на микроструктуре отолитов, следовательно, и влиять на процесс формирования метки. Возможно также, размещение бассейнов вне помещения и заметные суточные колебания температуры воды и воздуха нивелировали использованный нами температурный градиент (около 4 °С).

**Маркирование в возрасте 43–47 сут.** В третьей серии опыта маркировали личинок на завершающих стадиях метаморфоза. Использовали бассейны объёмом по 0,4 м<sup>3</sup>. В каждый бассейн было помещено по 45 экземпляров. Температура воды в бассейне с контрольной группой на протяжении эксперимента составляла 21,5–22,0 °С. Процесс охлаждения занимал около 55 мин, а нагрева – около 20. Метили экспериментальную группу путём охлаждения воды в бассейне 4 раза, схема мечения приведена на рис. 6.

Для предварительной оценки результатов мечения пробы отобрали через 5 сут. после завершения маркирования по 5 экз. из экспериментальной и контрольной групп. Выращивание оставшейся молодежи было продолжено с целью наблюдения за сохран-

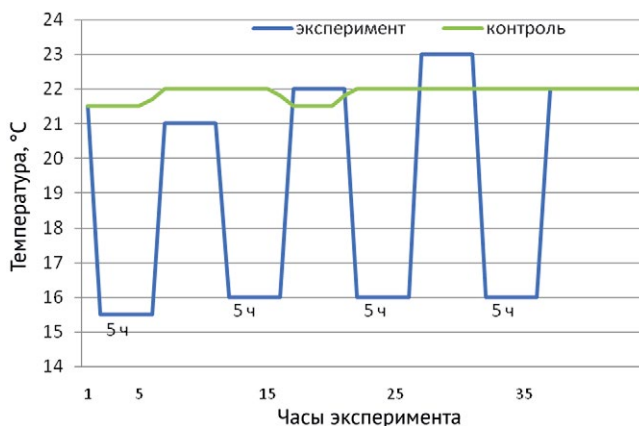


Рис. 6. Схема термического воздействия при маркировании личинок камбалы-калкана в возрасте около 45 сут.

Fig. 6. The scheme of thermal influence during marking of turbot larvae at the age of about 45 days

ностью меток. Для этого каждые 20 сут. отбирали по 5 экз. из группы.

На отолитах всех рыб из экспериментальной группы, просмотренных через 5, 25, 45 и 125 сут. после маркирования были обнаружены полосы меток запланированной структуры. Наиболее чётко эти следы температурного воздействия прослеживались на сагиттах. Метка визуализировалась как комплекс из четырех тонких тёмных полос. Подобные изменения микроструктуры отсутствовали на сагиттах молодежи контрольной группы. Метка была явно видна на сагиттах молодежи (рис. 7, 8), её формировала серия из четырёх ярких параллельных линий.

Таким образом, в возрасте после 50 сут. (завершающие стадии метаморфоза) на сагиттах хорошо заметны следы направленного температурного воздействия. Метки на сагиттах молодежи камбалы-калкана были хо-

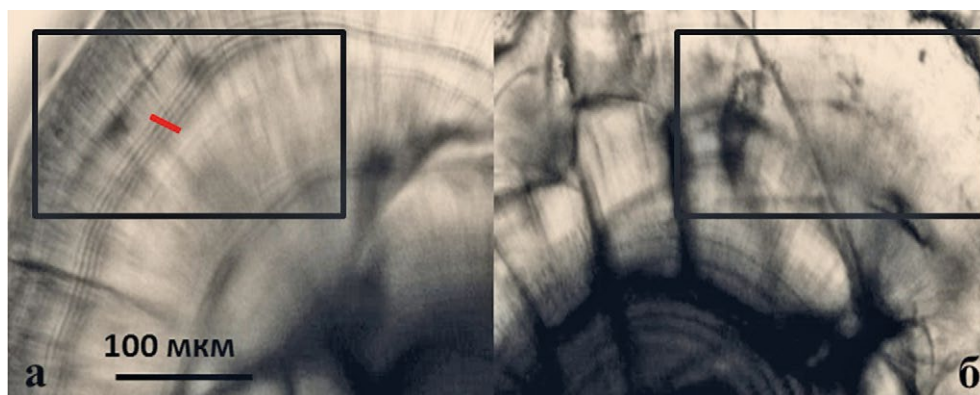
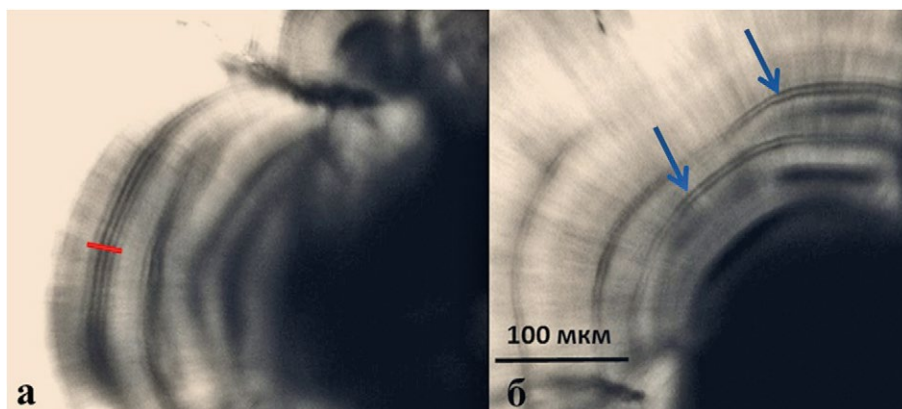


Рис. 7. Сагитты молодежи камбалы-калкана через 5 сут. после маркирования с кольцами метки, 200×; а – эксперимент; б – контроль

Fig. 7. Sagitta of turbot 5 days after marking experimental group (a) and control group (b), 200× (mark rings are indicated by the line)



**Рис. 8.** Сагитты молоди камбалы-калкана через 25 сут. после маркирования с кольцами термометки, 200×; а – эксперимент; б – контроль

**Fig. 8.** Sagitta of turbot 25 days after marking experimental group (a) and control group (b), 200× (mark rings are indicated by the line)

рошо различимы спустя 25 сут. На рис. 8а метки показаны красной линией. Несмотря на невысокую чёткость фотографии, на ней очень хорошо видны три кольца, менее чётко – четвёртое кольцо. При этом все кольца расположены на одинаковом расстоянии друг от друга.

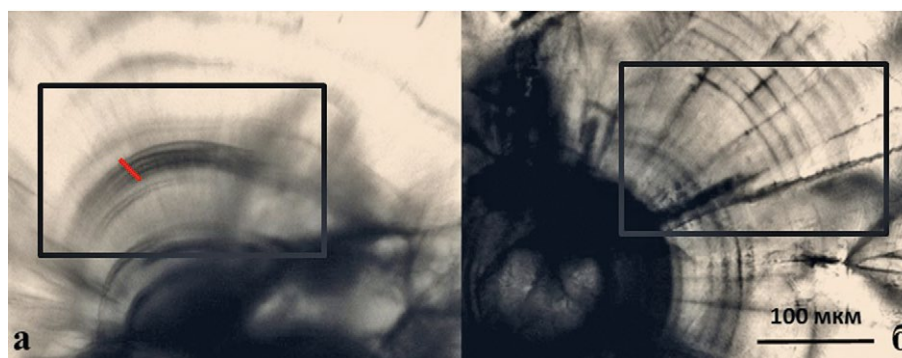
Интересно отметить, что на отолитах рыб контрольной группы (рис. 8б), в зоне, более близкой к центру (по сравнению с рис. 8а), видны по два близко расположенных кольца (отмечены синими стрелками). Появление этих микроструктурных образований, заметно более ярких, чем обычные суточные кольца, может быть обусловлено стрессами при внешних воздействиях (хэндлинг, пересадки и др.) или изменениям условий среды (солёности, температуры воды).

На рис. 9 приведены фотографии отолитов молоди, зафиксированной через 45 сут. после маркирования. Исследуемые зоны отолитов, соответствующие области предполагаемого обнаружения меток, обозначены чёрной линией. На рис. 9а просматривают-

ся последовательные кольца, расположенные друг от друга на близком расстоянии (отмечены красной линией). На рис. 9б подобной картины не наблюдается.

На отолитах молоди камбалы-калкана из экспериментального варианта, зафиксированной через 125 сут. после маркирования (рис. 10а), также хорошо различимы четыре параллельных кольца. На отолитах молоди из контрольного варианта подобные структуры не обнаруживаются (рис. 10б), имеющиеся на отолите кольца явно отличаются от группы колец меченой молоди (рис. 10а). Таким образом, можно говорить, что использованная нами техника маркирования обеспечивает возможность обнаружения метки, полученной путём отолитного маркирования в возрасте 45 сут. в течение, как минимум, 125 сут.

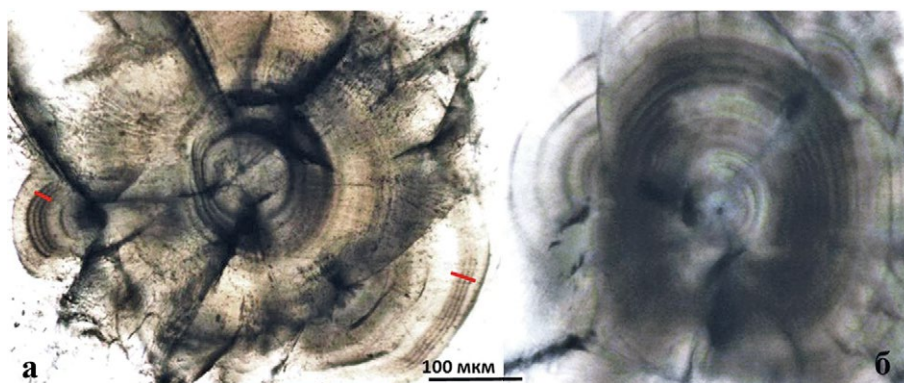
Причины появления ярких колец, выделяющихся в общей картине микроструктуры отолитов, лежат в расшифровке более тонких биохимических процессов кальцификации отолитов. S. Campana [1983] пи-



**Рис. 9.** Сагитты молоди камбалы-калкана через 45 сут. после маркирования с кольцами метки, 200×; а – эксперимент; б – контроль

**Fig. 9.** Sagitta of turbot 45 days after marking experimental group (a) and control group (b), 200× (mark rings are indicated by the line)





**Рис. 10.** Сагитты молоди камбалы-калкана через 125 сут. после маркирования с кольцами метки, 200×; а – эксперимент; б – контроль

**Fig. 10.** Sagitta of turbot 125 days after marking experimental group (a) and control group (b), 200× (mark rings are indicated by the line)

шет, что стресс снижает степень отложения кальция на отолитах, что может являться возможной причиной возникновения более ярких колец на отолитах. Такие опосредованные стрессом метки, по мнению американских авторов, представляют собой области пониженного или неупорядоченного роста отолитов [Campana, Neilson, 1985]. Эту же природу, судя по всему, имеют и так называемые кольца вылупления и кольца пигментации глаз у лососевых (*Salmonidae*). В такие периоды жизни темп роста кристаллов кальция снижается [Акиничева, 2006]. Можно предположить, что и причины возникновения колец метки аналогичны, и такие кольца можно считать стрессовыми. В то же время расстояние между кольцами зависит от времени между циклами мечения и температуры воды в эти периоды – чем выше температура воды, тем расстояние между полосами будет больше.

Подводя итог выполненных исследований, необходимо отметить следующее. Пересадка личинок перед выполнением опыта явилась очень сильным стрессовым фактором, не позволившим получить метки. Для получения ответа на вопрос о возможности мечения в раннем возрасте необходимо внесение существенных изменений в технику выполнения этой операции, в т. ч. исключение пересадок и сохранение условий для нормального питания личинок.

Температурный градиент при маркировании молоди камбалы-калкана должен составлять не менее 5–7 °С.

Количество циклов маркирования, по нашему мнению, должно быть не менее трёх, чтобы структура метки (рисунок, возникающий на отолитах в результате направленного воздействия факторов внешней среды) заметно выделялась на общем фоне суточных колец. Обычно стрессовые ситуации и важные переходные этапы жизни формируют не более 2 колец

подряд, поэтому метка, имеющая в своей структуре три-четыре ярких кольца, будет хорошо различима в дальнейшем. Для идентификации полученных меток в качестве регистрирующей структуры предпочтительнее использовать сагитты.

Таким образом, проведённое маркирование отолитов личинок камбалы-калкана можно считать успешным. Предварительно можно рекомендовать проводить маркирование в возрасте более 40 сут. В этом возрасте молодь жизнеспособна и устойчива не только к изменению температурного режима, но и к манипуляциям, связанным с маркированием. Полученные метки сохраняются и могут быть идентифицированы, по меньшей мере, в течение 125 сут. Возможность применения метода для личинок более раннего возраста может быть оценена после коррекции техники мечения с учётом исключения излишних пересадок и стабилизации температурных условий содержания личинок в период маркирования.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность за содействие в проведении исследований коллегам Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО» отдела «Керченский» В.Н. Туркуловой, Н.М. Буряку, Н.В. Новосёловой и всем сотрудникам научно-экспериментальной базы «Заветное» Азово-Черноморского филиала ФГБНУ «ВНИРО».

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

### Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы были соблюдены.

## Финансирование

Исследования проведены в рамках выполнения государственного задания ФГБНУ «ВНИРО» №№ Государственного учёта НИОКТР АААА-А20–12006029046–3 (2020 г.) и ЕГИСУ НИОКТР 121042800071–2 (2021 г.) по теме «Разработка методов оценки пополнения промыслового запаса объектов искусственного воспроизводства в модельных водоёмах Российской Федерации».

## ЛИТЕРАТУРА

- Акиничева Е.Г. 2006. Особенности сухого маркирования тихоокеанских лососей // Современные проблемы лососевых рыбоводных заводов Дальнего Востока. Мат. междунауч.-практ. семинара. Петропавловск-Камчатский: Камчатский печатный двор. С. 224–234.
- Куманцов М.И. 2013. Черноморская камбала-калкан: состояние запасов и пути их сохранения и восстановления // Труды ВНИРО. Т. 150. С. 21–34.
- Маслова О.Н. 2013. Разведение и товарное выращивание черноморской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus*: проблемы и методы // Труды ВНИРО. Т. 150. С. 35–49.
- Попова В.П., Кокос Л.М. 1973. О динамике стада черноморской камбалы-калкана и его рациональной эксплуатации // Труды ВНИРО. Т. 91. С. 151–160.
- Фурсенко Е.Б. 2021. Опыт термического мечения отолитов личинок щуки обыкновенной // Труды ВНИРО. Т. 183. С. 75–86. DOI: 10.36038/2307–3497–2021–183–75–86
- Ханайченко А.Н., Гиригосов В.Е. 2021. Черноморский калкан и его ближайший родственник, тюрбо. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ. 252 с. DOI 10.21072/978–5–6044865–6–6
- Bashey F.A. 2004. Comparison of the Suitability of Alizarin Red S and Calcein for Inducing a Non lethally Detectable Mark in Juvenile Guppies // Transactions of the American Fisheries Society. V. 133. Is. 6. P. 1516–1523. DOI: 10.1577/T03–073.1
- Bergstad O.A. Folkvord A. 1997. Dispersal of tagged juvenile turbot *Scophthalmus maximus* on the Norwegian Skagerrak coast // Fisheries Research. V. 29. Is. 3. P. 211–215. [https://doi.org/10.1016/S0165–7836\(96\)00543–7](https://doi.org/10.1016/S0165–7836(96)00543–7)
- Campana S.E. 1983. Factors affecting the production of daily growth increments in the otoliths of fishes. The University of British Columbia. 151 p.
- Campana S.E., Neilson J.D. 1985. Microstructure of fish otoliths // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. № 42. P. 1014–1032. DOI:10.1139/f85–127
- Campanella D., Garriz A., Colautti D.C., Somoza G.M., Miranda L.A. 2013. Osmotic induction marking with Alizarin Red S on juveniles of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atherinopsidae) // Neotropical Ichthyology. V. 11(1). P. 95–100. DOI:10.1590/S1679–62252013000100011
- Eckmann R., Rey P. 1987. Daily increments on the otoliths of larval and juvenile *Coregonus* spp., and their modification by environmental factors // Hydrobiologia. V. 148. P. 137–143. DOI: 10.1007/BF00008399
- Edeyer A., De Pontual H., Payan P., Troadec H., Severe A., Mayer-Gostan N. 2000. Daily variations of the saccular endolymph and plasma compositions in the turbot *Psetta maxima*: relationship with the diurnal rhythm in otolith formation // Mar. Ecol. Prog. Ser. № 192. P. 287–294. DOI: 10.3354/meps192287
- Iglesias J., Rodriguez-Ojea G. 1997. The use of alizarin complexone for immersion marking of the otoliths of embryos and larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Dosage and treatment time // Fisheries Management and Ecology. V. 4 (5). P. 405–417. DOI: 10.1046/j.1365–2400.1997.00052
- Isshiki T., Katayama S. 2007. Otolith staining by oral administration of alizarin complexone with enteric-coated microcapsules for juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) // Bull. Kanagawa Prefect. Fish. Tech. Cent. I. 2. P. 43–49
- Liu Q., Zhang X.M., Zhang P.D., Sylvanus N. 2009. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) // Fisheries Research. V. 98 (1). P. 67–74. DOI: 10.1016/j.fishres.2009.03.014
- Oesau S., Thaller G., Schulz C., Tetens J. 2013. Application of PIT tags for individual identification of turbot (*Scophthalmus maximus*) // Archiv Tierzucht. V. 56. 28. P. 285–292. DOI: 10.7482/0003–9438–56–028
- Victor B.C. 1982. Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses, *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus* // Mar. Biol. V. 71. P. 203–208. DOI: 10.1007/BF00394631
- Walker S.P.W., McCormick M.I. 2004. Otolith-check formation and accelerated growth associated with sex change in an annual protogynous tropical fish // Mar. Ecol. Prog. Se. Vol. 266. P. 201–212. DOI:10.3354/meps266201
- Wang N., Eckmann R. 1992. Effects of photoperiod, feeding regime and water temperature on the formation of daily growth increments in otoliths of larval pike (*Esox lucius* L.) // J. Appl. Ichthyol. V. 8. P. 246–250. DOI: 10.1111/j.1439–0426.1992.tb00690.x
- Yang K., Zeng R., Gan W., Deng L., Song Z. 2016. Otolith fluorescent and thermal marking of elongate loach (*Leptobotia elongata*) at early life stages // Environ. Biol. Fish. V. 99. P. 687. DOI: 10.1007/s10641–016–0509–6

## References

- Akinicheva E.G. 2006. Features of dry marking of Pacific salmon // Modern problems of salmon hatcheries in the Far East. Mat. inter. sci.-prakt. the seminar. Petropavlovsk-Kamchatsky: Kamchatka Printing Yard. P. 224–234 (In Russ.).
- Kumantsov M.I. 2013. Black Sea turbot: state of reserves and ways of their conservation and restoration // Trudy VNIRO. Vol. 150. P. 21–34 (In Russ.).
- Maslova O.N. 2013. Breeding and commercial cultivation of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*: problems and methods // Trudy VNIRO. T. 150. P. 35–49 (In Russ.).
- Popova V.P., Kokoz L.M. 1973. Dynamics of the population of the Black Sea turbot and its rational exploitation // Trudy VNIRO. Vol. 91. pp. 151–160 (In Russ.).
- Fursenko E.B. 2021. Thermal marking of otoliths in common pike larvae // Trudy VNIRO. Vol. 183. P. 75–86. DOI: 10.36038/2307–3497–2021–183–75–86 (In Russ.).

- Khanaichenko A.N., Giragosov V.E.* 2021. The Black Sea kalkan and its closest relative, turbot. Sevastopol: FITZ InBUM. 252 p. DOI 10.21072/978-5-6044865-6-6 (In Russ.).
- Bashey F.A.* 2004. Comparison of the Suitability of Alizarin Red S and Calcein for Inducing a Non lethally Detectable Mark in Juvenile Guppies // Transactions of the American Fisheries Society. V. 133. Is. 6. P. 1516–1523. DOI: 10.1577/T03-073.1
- Bergstad O.A., Folkvord A.* 1997. Dispersal of tagged juvenile turbot *Scophthalmus maximus* on the Norwegian Skagerrak coast // Fisheries Research. V. 29. Is. 3. P. 211–215. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(96\)00543-7](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(96)00543-7)
- Campana S.E.* 1983. Factors affecting the production of daily growth increments in the otoliths of fishes. The University of British Columbia. 151 p.
- Campana S.E., Neilson J.D.* 1985. Microstructure of fish otoliths // Can. J. of Fisheries and Aquatic Sciences. № 42. P. 1014–1032. DOI:10.1139/f85-127
- Campanella D., Garriz A., Colautti D.C., Somoza G.M., Miranda L.A.* 2013. Osmotic induction marking with Alizarin Red S on juveniles of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atherinopsidae) // Neotropical Ichthyology. V. 11 (1). P. 95–100. DOI:10.1590/S1679-62252013000100011
- Eckmann R., Rey P.* 1987. Daily increments on the otoliths of larval and juvenile *Coregonus* spp., and their modification by environmental factors // Hydrobiologia. V. 148. P. 137–143. DOI: 10.1007/BF00008399
- Edeyer A., De Pontual H., Payan P., Troadec H., Severe A., Mayer-Gostan N.* 2000. Daily variations of the saccular endolymph and plasma compositions in the turbot *Psetta maxima*: relationship with the diurnal rhythm in otolith formation // Mar. Ecol. Prog. Ser. № 192. P. 287–294. DOI: 10.3354/meps192287
- Iglesias J., Rodriguez-Ojea G.* 1997. The use of alizarin complexone for immersion marking of the otoliths of embryos and larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Dosage and treatment time // Fisheries Management and Ecology. V. 4 (5). P. 405–417. DOI: 10.1046/j.1365-2400.1997.00052
- Isshiki T., Katayama S.* 2007. Otolith staining by oral administration of alizarin complexone with enteric-coated microcapsules for juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) // Bull. Kanagawa Prefect. Fish. Tech. Cent. I. 2. P. 43–49
- Liu Q., Zhang X.M., Zhang P.D., Sylvanus N.* 2009. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) // Fisheries Research. V. 98 (1). P. 67–74. DOI: 10.1016/j.fishres.2009.03.014
- Oesau S., Thaller G., Schulz C., Tetens J.* 2013. Application of PIT tags for individual identification of turbot (*Scophthalmus maximus*) // Archiv Tierzucht. V. 56. 28. P. 285–292. DOI: 10.7482/0003-9438-56-028
- Victor B.C.* 1982. Daily otolith increments and recruitment in two coral-reef wrasses, *Thalassoma bifasciatum* and *Halichoeres bivittatus* // Mar. Biol. V. 71. P. 203–208. DOI: 10.1007/BF00394631
- Walker S.P.W., McCormick M.I.* 2004. Otolith-check formation and accelerated growth associated with sex change in an annual protogynous tropical fish // Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 266. P. 201–212. DOI:10.3354/meps266201
- Wang N., Eckmann R.* 1992. Effects of photoperiod, feeding regime and water temperature on the formation of daily growth increments in otoliths of larval pike (*Esox lucius* L.) // J. Appl. Ichthyol. V. 8. P. 246–250. DOI: 10.1111/j.1439-0426.1992.tb00690.x
- Yang K., Zeng R., Gan W., Deng L., Song Z.* 2016. Otolith fluorescent and thermal marking of elongate loach (*Leptobotia elongata*) at early life stages // Environ. Biol. Fish. V. 99. P. 687–695. DOI: 10.1007/s10641-016-0509-6

Поступила в редакцию 15.04.2022 г.  
Принята после рецензии 05.08.2022 г.