

УДК 639.3 : 593.953

Г.Г. Калинина, В.В. Евдокимов, И.В. МатросоваДальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГАМЕТ И ИХ ПОТЕНЦИЙ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВЕТОМ НА МОРСКОГО ЕЖА
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

*Проведено исследование влияния монохроматического света на половой процесс серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в контролируемых условиях. Масса гонад морских ежей, объем ацинусов, рост и созревание гамет свидетельствовали о том, что красный и зеленый свет на фоне температурной стимуляции оказывает определенное воздействие на половой процесс морских ежей, причем его проявление на процессы оо- и сперматогенеза различно, красный свет стимулирует, а зеленый угнетает, что отражается на морфофункциональных показателях.*

Ключевые слова: морской еж, гаметы, свет, половой процесс.

G.G. Kalinina, V.V. Evdokimov, I.V. Matrosova**MORPHOFUNCTIONAL ESTIMATE OF GAMETS AND THEM POTENTIONS
WHEN INFLUENCE LIGHT ON THE GREY SEA URCHINS
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

*Research of influence monochromatical light on the grey sea urchins *Strongylocentrotus intermedius* sexual process in artificial conditions were conducted. Weight sea urchins gonad, volume of acinuses, growth and maturing of gametes, testified that red and green light, on a background of temperature stimulation, renders the certain influence on sexual process of sea urchins, and its display on processes oo-and spermatogenesis variously, red light stimulates, and green oppresses, that is reflected on morphofunctional parameters.*

Key words: sea urchin, gamets, light, sex process.

Введение

Исследования проводили на морском еже *Strongylocentrotus intermedius*. Мы использовали определенные зоны спектров света, исходя из анализа собственных данных [1]. Выбранный свет соответствует местам обитания морских ежей в естественных условиях (от 300 до 800 нм). Для определения морфофункциональной оценки гамет и их потенций у ежей мы использовали стандартные абсорбционные светофильтры: ЗС-2, который поглощает все спектры света, кроме зеленого (495-550 нм), и КС-11, который поглощает все спектры света, кроме красного (675-770 нм). Красный свет мы условно обозначаем 720 нм, зеленый свет – 520 нм.

Объекты и методы исследований

Эксперименты проводились с использованием метода температурной стимуляции [2]. Этот метод удобен для экспериментального изучения регуляторных механизмов роста и созревания гамет морских ежей при промышленном их воспроизводстве, так как позволяет в любое время года иметь в достаточном количестве зрелые гаметы, которые можно использовать для различных экспериментальных исследований, а также для получения спата в хозяйствах марикультуры. Он относится к современным мировым биотехнологиям в области марикультуры.

Метод стимуляции гаметогенеза морских ежей заключался в том, что в сжатые сроки в лабораторных условиях воспроизводился ход изменения температуры воды естественной среды. Рассчитывалась сумма градусодней, необходимая для созревания гамет у животных с учетом сезона года.

Весной гонадный индекс и объем половых клеток находятся в линейной зависимости от температуры воды:

$$T = 803 \cdot 10^{-7} \cdot V - 5,9; \quad T = 1,99 \cdot G - 29,15,$$

где T – температура; V – объем клеток; G – гонадный индекс.

С помощью формул зависимости величины гонадного индекса и размера половых клеток от суммы температур определяли количество градусодней, полученных морскими ежами в море и необходимых для созревания половых клеток в искусственных условиях. Для этого измеряли температуру воды в период взятия животных из моря. Сумму градусодней рассчитывали по формуле

$$D = d(t - t_0),$$

где D – сумма градусодней; d – время, сут; t – температура окружающей среды; t_0 – критическая температура.

Стимуляция гаметогенеза морского ежа включала 3 периода:

1. Адаптация к искусственной среде при температуре, соответствующей температуре воды в море.
2. Адаптация гаметогенеза – сжатое воспроизведение естественного хода температур, при котором созревают гонады.
3. Завершение гаметогенеза с помощью устойчивых температур (зависит от уровня развития гонады).

Исходная температура в емкостях с производителями задавалась в зависимости от зрелости гонады и температуры воды в море в момент взятия морского ежа.

При активации гаметогенеза температуру воды доводили до 14-16 °С и поддерживали на таком уровне три недели. Далее температуру поднимали до нерестовой (18-21 °С).

Период завершения гаметогенеза составлял 7 сут.

Эксперименты проводили в весенний период, когда ежи находились на стадии пролиферации – первая стадия, в течение трех лет. Всего поставлено 6 опытов, в которых исследовано 1440 серых морских ежей.

Морских ежей размером 60-80 мм отлавливали в море, перевозили в лабораторию и помещали в аквариумы с той же температурой воды, что и в естественных условиях, для прохождения адаптации. В воде с этой температурой ежей выдерживали 1-2 сут, после чего производили медленное повышение температуры на 1-2 °С. Время, в течение которого животные находились при заданной температуре, зависело от их состояния. Если ежи интенсивно работали амбулакральными ножками, активно передвигались, имели упругие иглы, значит, адаптация происходила успешно, и температуру повышали, если этого не наблюдалось, температуру оставляли прежней. После адаптации животных помещали в опыт.

В аквариумы помещалось по 30 животных. Три аквариума были полностью затемнены, в два из них подавался свет определенного спектра. Третий оставался затемненным и служил контролем для определения воздействия тепловых лучей. Один аквариум оставался незатемненным.

В незатемненном аквариуме животные подвергались температурной стимуляции при освещении белым светом, это мы принимали за контроль. В первом, затемненном аква-

риуме, ежей на фоне температурной стимуляции подвергали воздействию светом с длиной волны 720 нм, применяя светофильтр марки «КС-11». Во втором, затемненном аквариуме, животных на фоне температурной стимуляции освещали светом с длиной волны 520 нм, используя для этого светофильтр марки «ЗС-2». В третьем, затемненном аквариуме, ежи находились без освещения, только под воздействием температурной стимуляции.

Для исключения влияния ультрафиолетового света животных содержали в стеклянных аквариумах, поскольку стекло не пропускает ультрафиолетовый свет.

Воздействие тепловых волн мы пытались анализировать, используя для этой цели затемненные аквариумы, где содержали животных при постоянной температуре воды.

На протяжении всего эксперимента источником света в аквариумах, где анализировался красный и зеленый свет, была электрическая лампа (25 Вт), освещенность достигалась с помощью электронного реле регулятора (ЭРМ) и составляла 20 лк. Нужную температуру во всех аквариумах устанавливали по контактному электротермометру и поддерживали с помощью реле регулятора автоматически. Аэрацию воды производили посредством микрокомпрессоров МК-1. В качестве корма использовали водоросли: ламинария японская *Laminaria japonica*, ульва фенестрата *Ulva fenestrata*, тихокарпус косматый *Tichocarpus crinitus*, грацилярия бородавчатая *Gracilaria verrucosa*. Водоросли подавали ежам в равных количествах во все аквариумы одновременно.

Опыты по выявлению воздействия света на репродуктивный процесс морских ежей на фоне температурной стимуляции проводили параллельно с опытами без температурной стимуляции для определения только светового влияния. Для этого морских ежей помещали в аналогичные условия в такие же аквариумы и содержали при постоянной температуре воды, адекватной той, что и в естественных условиях моря в этот весенний период.

Стадии развития гонады морского ежа определяли по шкале, предложенной Ю.С. Хотимченко с соавторами [3].

Перед помещением животных в эксперимент для исследования использовали гонады от 10 самок и 10 самцов, при промежуточных наблюдениях из каждого аквариума брали по 5 особей обоего пола, оставшихся животных вскрывали в конце эксперимента. В начале опыта, на промежуточном этапе (через 15 сут после начала эксперимента), и в конце опыта (через 30 сут) у ежей определяли тургор, цвет и массу гонад, после чего для микроскопического изучения из половой железы вырезали кусочки ткани размером 5x5 мм, которые фиксировали в жидкости Буэна и 10%-м растворе нейтрального формалина. По общепринятой гистологической методике полученный материал заливали в парафин [4]. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали железным гематоксилином и гематоксилином Эрлиха с докраской 0,5%-м раствором эозина. Для оценки состояния гонад определяли средний объем ацинусов, половых клеток, их ядер и ядрышек по формуле эллипсоида: $V = \pi/6 \times A \times B^2$, где A – большой, B – малый диаметры.

Качественные изменения в гонадах самок определяли по наличию в ацинусах половых клеток различных стадий развития. Для этого все половые клетки были разделены на пристеночные, свободнолежащие ооциты и половые клетки, готовые к вымету.

У самцов выделяли зоны размножения, роста, формирования и зону, незанятую половыми клетками. Используются критерии достоверности различий при уровне значимости $P = 0,01$. Все полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики [5].

В конце эксперимента определяли плодовитость у морских ежей по методу С.Н. Яковлева [6]. Для подсчета яйцеклеток у самок после измерения диаметра панциря целиком удаляли яичники, определяли их объем в мерном цилиндре с морской водой и фильтровали через газ. Полученную суспензию, состоящую почти целиком из гамет, доводили до 100 мл и под биноклем в камере Богорова подсчитывали количество яйцеклеток, содержащихся в 1 мл конечной суспензии. Затем определяли общее количество яйцеклеток, содержащихся в яичниках одной самки.

С помощью эмбриональных экспериментов определяли полноценность полученных гамет. Для того чтобы судить, насколько потенции гамет животных отличаются при формировании в гонадах морских ежей после воздействия на животных красным и зеленым светом, мы прослеживали ранний онтогенез, ориентируясь на стадии развития. Определяли наступление стадий развития, закладку органов, долю аномалий. Развитие ежей прослеживали до плутеуса I стадии.

Изучение раннего онтогенеза морского ежа проводили следующим образом. Половые продукты от половозрелых морских ежей получали у самок введением в перивисцеральную полость 0,5 мл 0,5 М раствора KCl. У самцов железу извлекали из перивисцеральной полости в чашку Петри; концентрированную сперму забирали микропипеткой. Осеменивание проводили в следующем порядке. Яйца, суспензированные в морской воде, оседали, затем большая часть воды сливалась. Каплю «сухой» спермы разводили 5 мл морской воды. Разбавленную сперму смешивали с яйцеклетками. Через 1-2 мин суспензию разбавляли в 15 раз морской водой и после оседания яйцеклеток воду заменяли новой. Дополнительно зиготы промывали два раза свежей морской водой.

Осеменивание яйцеклеток и последующую инкубацию зародышей проводили при температуре 19 °С. Развитие зигот до плутеуса I стадии происходило в морской воде, профильтрованной через бумажный фильтр.

В процессе опытов морская вода имела следующие показатели: pH 8,4-7,95; концентрация кислорода 12,4-9,9 мг/л; соленость 33-30‰.

Полученные гистологические препараты изучались и фотографировались в проходящем свете при различном увеличении (9 x 10, 8 x 20, 8 x 40, 9 x 100) на микроскопе «Olympus» ВНТ с использованием Olympus Photomicrographic System Model PM-10 AD и цифровой фотокамеры «Digital camera» C-2020 ZOOM.

Математическую обработку данных, полученных в результате исследований, проводили на персональном компьютере IBM PC/AT с использованием электронных таблиц Microsoft Excel.

Результаты

В результате проведенных исследований нами было установлено воздействие света с длиной волны 720 нм и 520 нм на половой процесс морских ежей. Изучение воздействия света при постоянной температуре +4 °С позволило установить, что свет 720 нм положительно действует на репродуктивный процесс. Это выражается в нарастании массы гонады на $2,0 \pm 0,3$ г, увеличении числа пристеночных ооцитов на 20 % и свободнолежащих ооцитов вдвое в сравнении с контролем. Свет с длиной волны 520 нм оказывает негативное воздействие на гонадогенез морских ежей. Это выражается в уменьшении объема ацинусов в 1,5 раза, в уменьшении сперматоцитов на 10 % в сравнении с контролем.

На фоне температурной стимуляции отмечается, что исследуемые длины волн оказывают различное воздействие на половые железы морских ежей в соответствии с законом Вант-Гоффа-Аррениуса, т.е. скорость ферментативных реакций при повышении температуры на 1 °С возрастает на 9,6 %, что соответствует $Q_{10} = 2$.

Критерием оценки нормального развития репродуктивных органов морских ежей при световой стимуляции являлись изменения массы гонады, размер ацинусов и количество в них клеточных элементов. Их удобно сопоставить с соответствующими параметрами гонад животных, обитающих в естественных условиях.

Масса гонад

Средняя масса зрелой гонады у морского ежа $25,0 \pm 0,5$ г. При воздействии светом 720 нм на фоне температурной стимуляции происходит закономерное увеличение массы на ста-

тистически достоверную величину. Нарастание массы гонад у животных зависит от длительности температурной стимуляции, от ее исходного состояния и влияния световой волны.

Размеры ацинусов

У животных вместе с массой гонад в ходе экспериментов увеличиваются объемы ацинусов. Они при световом воздействии на фоне температурной стимуляции изменяются на статистически достоверную величину ($P < 0,001$).

Рост ооцитов и изменение клеточного состава гонад

Для того чтобы судить о качественных изменениях в гонаде самок, исследовались следующие гаметы.

Пристеночные ооциты – это клетки, преобладающие в начале опыта. В ходе эксперимента число их уменьшается и резко сокращается в конце опыта.

Число свободнолежащих ооцитов увеличивается в ходе опытов. Часть их в ходе экспериментов подвергается резорбции с образованием трофического субстрата, т.е. наблюдается то же, что происходит и в процессе естественного гаметогенеза. Разница заключается в том, что резорбция выросших клеток при воздействии красным и зеленым светом на фоне температурной стимуляции регистрируется на коротком отрезке времени и носит более выраженный характер. Число свободнолежащих ооцитов заметно увеличивается на промежуточных этапах и сокращается к концу опытов.

В конце опытов преобладают зрелые яйцеклетки. Наглядным показателем прогрессирующего развития гонады следует считать закономерное увеличение средних объемов клеток, постоянство ядерно-плазменных, ядрышко-ядерных отношений на протяжении роста ооцитов и уменьшение ядерно-плазменного коэффициента в зрелых яйцеклетках.

Изменение клеточного состава в ацинусах самцов

При сперматогенезе у морского ежа дифференцировка гамет в ацинусах идет от периферии к центру. На базальной мембране располагаются сперматогонии, образуя зону размножения. За зоной размножения располагается зона роста, которая представлена сперматоцитами I и II порядка. Далее в центре ацинусов сперматиды и спермии образуют зону формирования. Зрелость железы определяется двумя показателями: величиной зоны формирования и плотностью распределения в них клеточных элементов. В процессе светового воздействия на фоне температурной стимуляции происходит активация сперматогенеза. Прежде всего, заметно расширяется зона роста и формирования, к концу опытов зрелость гонад увеличивается. При этом следует отметить, что животные, содержащиеся под воздействием света с длиной волны 520 нм, в конце опытов не содержат выраженной зоны формирования.

Таким образом, масса гонад морских ежей, объем ацинусов, рост и созревание гамет свидетельствуют о том, что красный и зеленый свет на фоне температурной стимуляции оказывает определенное воздействие на половой процесс морских ежей, причем его проявление на процессы оо- и сперматогенеза различно, красный свет стимулирует, а зеленый угнетает, что отражается на морфофункциональных показателях.

Проведенные исследования по определению плодовитости у морских ежей, находящихся под воздействием монохроматического света на фоне температурной стимуляции, преследовали одну цель: показать, влияет ли свет определенной длины волны на формирование гамет. Для решения поставленной задачи определяли плодовитость у самок морских ежей на преднерестовой стадии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наименьшая плодовитость – $23,0 \pm 1,7$ млн яйцеклеток – у ежей из опыта, где животные содержались под воздействием зеленого света, наибольшая – $30,1 \pm 1,9$ млн яйцеклеток - при освещении ежей красным светом.

Эмбриологические наблюдения

В процессе экспериментальных исследований установлено, что гаметы, полученные у ежей после содержания их под воздействием красного и зеленого света, обладают различной потенциальной возможностью. Это выражается в выживаемости эмбрионов в процессе прослеженного раннего онтогенеза. Минимальная доля отклонений от нормального развития (8 %) наблюдается у эмбрионов из гамет, полученных от ежей, содержавшихся при освещении светом длиной волны 720 нм. Максимальная доля аномалий (30 %) в ходе раннего онтогенеза у животных при воздействии на них светом 520 нм. Все это свидетельствует о том, что потенции гамет у морских ежей, сформировавшиеся под воздействием красного света, реализуются у организмов наиболее полно.

Заключение

Проведенные экспериментальные исследования на морских ежах позволили установить, что в процессе светового воздействия на фоне температурной стимуляции у них происходит достоверное увеличение веса гонады, размеров ацинусов, созревание половых гамет, т.е. наблюдается комплекс прогрессивных формативных изменений.

Учитывая ведущее значение женского гонадогенеза, в первую очередь необходимо было доказать полноценность «искусственно полученных» яйцеклеток. Для этого использовались цитологические, морфометрические и эмбриологические методы исследования. При эмбриологических методах определялась равная потентность как яиц, так и спермиев.

Наглядным показателем нормального развития яйцеклеток следует считать закономерное увеличение их средних объемов, постоянство ядерно-плазменных отношений на протяжении роста ооцитов и резкое уменьшение этого показателя после редукционных делений в зрелых яйцеклетках.

Большую роль в плане доказательства полноценности полученных гамет играет эмбриологический метод. Поэтому каждый опыт заканчивался оплодотворением половых клеток и изучением раннего онтогенеза морских ежей вплоть до образования малого плутеуса. Во всех наблюдениях оплодотворение происходило одновременно, дробление начиналось с закладки меридиональных борозд, характеризовалось равномерностью и синхронностью. В результате дробления формировались бластула, гастрюла, призма, плутеус. Отклонений от нормального развития наблюдалось не более чем при изучении дробящихся клеток, созревающих в естественных условиях.

Таким образом, морфологическое, морфометрическое и эмбриологическое изучение половых клеток, полученных в эксперименте со световой стимуляцией, доказывает их равноценность с яйцеклетками, сформированными в естественных условиях. Следует отметить, что исследуемые длины волн оказывают различное воздействие на половые железы морских ежей.

Полученные нами данные указывают на то, что свет не только определенным образом действует на репродуктивный процесс морского ежа, но его воздействие на процессы оо- и сперматогенеза различно.

Свет с длиной волны 720 нм активизирует развитие гонад. Об этом свидетельствуют увеличение таких показателей, как масса гонад, число половых клеток в ацинусах. У ежей увеличивается плодовитость, повышается жизнестойкость эмбрионов. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными других авторов, отмечающих положительное действие тепловых лучей на развитие организма [7, 8].

Свет с длиной волны 520 нм тормозит развитие гонад морских ежей, т.е. снижает содержание оогониев и сперматогониев, но при этом не нарушается структура клеток.

Световые сигналы поступают в клетки морских ежей через сложный сенсорно-секреторный комплекс, находящийся на поверхности подий и иридофоры морских ежей, и служат, по-видимому, рефлектором кожных фоторецепторов [9]. Посредником между световым воздействием из окружающей среды и половым процессом морских ежей является нервная система. Ее нейроны секретируют разнообразные биологически активные вещества (биогенные моноамины, нейропептиды), которые доставляются к гонаде гуморальным путем и аксональным транспортом. Мешенью для нейропептидов считаются вспомогательные (фоликулярные) клетки, способные продуцировать стероидные гормоны [3].

Половые стероидные гормоны в семенниках ежей ускоряют пролиферацию гониев, созревание сперматоцитов II, формирование сперматид и спермиев, а в яичниках - пролиферацию гониев, цито- и трофоплазматический рост за счет активации синтетических процессов как в половой железе, так и в самом ооците.

Мы полагаем, что свет 720 нм, по всей видимости, активизирует выработку стероидных гормонов, поскольку в наших опытах отмечается увеличение аналогичных параметров половой железы. В сравнении с контролем: масса гонады больше на $2,0 \pm 0,3$ г, количество пристеночных ооцитов - на 4 %, свободнолежащих ооцитов - на 50 %, зрелых гамет - на 8 %.

В семенниках количество сперматоцитов почти вдвое больше, чем в контроле, а зона формирования полностью занимает ацинус.

Плодовитость в опытах при освещении светом 720 нм увеличивается на $3,0 \pm 0,2$ млн в сравнении с контролем. Действие красного и зеленого света на жизнедеятельность морских ежей в конечном итоге отражается на жизнестойкости эмбрионов, которые развиваются из гамет, обладающих различной потенциальной возможностью. Это объясняется, по всей видимости, тем, что согласно литературным данным [3] формирующиеся в ооците пептидергическая и стероидергическая системы сохраняются после его созревания и начинают функционировать в раннем эмбриогенезе, осуществляя регуляцию развития.

Совершенно очевидно, что исследование размножения морских ежей, при воздействии на них определенными световыми волнами в комплексе с другими экологическими факторами, важно для изучения морфофункциональной оценки гамет и продукционных возможностей этих животных при воспроизводстве их в искусственных и естественных условиях.

Проведенные нами исследования позволяют ответить на вопрос, который стоит перед морскими хозяйствами и от правильного ответа на который зависит успешное развитие прибрежного рыболовства. Для мореводов необходимо знать, какая стадия жизненного цикла промыслового объекта (в данном случае морского ежа) лимитирует формирование запасов и какие мероприятия при этом следует проводить. Согласно литературным данным [7, 8] основными лимитирующими факторами являются: 1) развитие гонад; 2) гибель личинок; 3) выживаемость молоди. Мы считаем, что первый фактор является основополагающим, т.е. количество полноценных гамет, формирующихся у морских ежей, в значительной мере определяет успешное развитие прибрежного рыболовства. Проведенное нами исследование позволяет рекомендовать получение в контролируемых условиях жизнестойкой молоди из гамет морских ежей, которые на фоне температурной стимуляции подвергаются воздействию светом 720 нм. Полученная молодь из гамет от производителей, подвергшихся воздействию красным светом на фоне температурной стимуляции, обладающая повышенной жизнестойкостью, в дальнейшем может выращиваться с применением различных биотехнологий при донном и садковом воспроизводстве в морских хозяйствах.

Список литературы

1. Калинина Г.Г., Евдокимов В.В., Матросова И.В. Влияние монохроматического света на половой процесс серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: материалы II Междунар. науч.-техн. конф. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2012.
2. Евдокимов В.В., Бирюкова И.В., Евдокимов А.В. Воздействие света с различной длиной волны на гаметогенез черного морского ежа (*Strongylocentrotus nudus*) // Морфология. – 2001. – Т. 120, № 6. – С. 75-79.
3. Хотимченко Ю.С., Деридович И.И., Мотавкин П.А. Биология размножения и регуляция гаметогенеза и нереста у иглокожих. – М.: Наука, 1993. – 168 с.
4. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1989.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 184 с.
6. Яковлев С.Н. Плодовитость морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и методы ее оценки // Биол. моря. – 1987. – № 5. – С. 46-52.
7. Евдокимов В.В. Изучение размножения морских ежей в условиях марикультуры в ТИНРО-Центре // Изв. ТИНРО. – 2005. – Т. 141. – С. 284-295.
8. Константинов А.С., Пушкарь В.Я., Аверьянова О.В. Влияние колебаний абиотических факторов на метаболизм некоторых гидробионтов // Изв. АН. Сер. биол. – 2003. – № 6. – С. 728-734.
9. Deridovich I.I., Motavkin P.A., Evdokimov V.V. et al. Marine biotechnology. Vol. 1. Endocrinology and Reproduction. New Delhi; Calcutta: Oxford & IBN Publishing Co. PVT. LTD, 1998. P. 1-78.

Сведения об авторах: Калинина Галина Георгиевна, кандидат биологических наук, профессор;

Евдокимов Владимир Васильевич, доктор биологических наук, профессор,
e-mail:evdokimov@tinro.ru;

Матросова Инга Владимировна, кандидат биологических наук, доцент,
e-mail:ingam@rbcmail.ru.