

На правах рукописи

НЕЗНАНОВА Светлана Юрьевна

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА КАМБАЛ
HIPPOGLOSSOIDES DUBIUS И *HIPPOGLOSSOIDES (CLEISTHENES) HERZENSTEINI* В
СВЯЗИ С ПРОБЛЕМОЙ ИХ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ

03.00.10 – ихтиология

03.00.30 – биология развития, эмбриология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

ИЗУ

Владивосток

2006

Работа выполнена в Дальневосточном государственном университете

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВНИРО
№ _____
Библиотек

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Иванков Вячеслав Николаевич
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Реунов Аркадий Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Долганов Владимир Николаевич
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Евдокимов Владимир Васильевич

Ведущая организация Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

Защита состоится « 6 » июня 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета
Д 005.008.02 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу:
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан « 5 » мая 2006г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Е. Костина

Актуальность исследований. Современный уровень филогенетических исследований в значительной степени сопряжен с применением методов молекулярного анализа, которые привлекают ограниченный объем генетической информации и поэтому не обладают репрезентативностью, достаточной для построения полноценных филогенетических моделей. В соответствии со сформировавшимся мнением многих исследователей наиболее объективным методом современной кладистики является совместное использование нескольких типов филогенетических признаков. Анализ генетического материала – наиболее перспективный метод, должен дополняться привлечением данных, полученных на анатомическом и цитологическом уровнях (Гладышев, Дроздов, 2002). К настоящему времени выяснено, что для суждения о родственных отношениях, филогении и систематике организмов актуально использование строения половых клеток (Иванков, 1987; Дроздов, Иванков, 2000). Как правило, для сравнительного анализа используется строение зрелых гамет – яйцеклеток и сперматозоидов. В последние годы в научной литературе появились данные, согласно которым для таксономического анализа могут привлекаться как оогенные, так и сперматогенные клетки, находящиеся на разных фазах роста и этапах дифференциации. Однако, большая часть исследований в этой области выполнена на гистологическом уровне, возможности которого широки, но не обладают аналитической полнотой ультраструктурного анализа. В данной диссертационной работе впервые продемонстрированы возможности электронной микроскопии, как метода, с помощью которого при исследовании гаметогенеза выявляется целый ряд дополнительных признаков, пригодных для выяснения степени филогенетического родства. Впервые на новой основе изучены некоторые аспекты оогенеза и сперматогенеза двух видов камбаловых рыб, степень филогенетической близости которых является предметом дискуссий. Среди этих аспектов рассматриваются ультраструктурная организация вспомогательных клеток, ультраструктурные особенности формирования желтка и оболочек ооцитов, особенности сперматогенеза и резорбции спермиев. Благодаря ультраструктурному анализу, проведенному в настоящей работе, стало очевидным, что различия могут быть обнаружены не только в строении половых и вспомогательных клеток, но и в механизмах их формирования и функционирования. Сравнительный электронно-микроскопический анализ ультратонких процессов гаметогенеза может быть рекомендован к использованию как новый дополнительный эффективный метод при решении таксономических задач в ихтиологии. Таким образом, впервые в

ихтиологической практике на защиту выносятся филогенетически направленный подход сравнительного анализа ультраструктурных механизмов гаметогенеза.

Цель работы - Продемонстрировать возможность применения сравнительного анализа ультраструктурных особенностей гаметогенеза для выяснения таксономической близости видов на примере камбаловых рыб *H. (Hippoglossoides) dubius* и *H. (Cleisthenes) herzensteini*.

Для осуществления данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать ультраструктурную организацию мужских и женских половых клеток япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini* камбал.
2. На ультраструктурном уровне исследовать механизмы резорбции сперматозоидов у япономорской палтусовидной и остроголовой камбал.
3. Провести сравнительный ультраструктурный анализ сперматогенеза, оогенеза и вспомогательных клеток япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini* камбал.

Научная новизна работы. Впервые в ихтиологической практике для сравнительного анализа привлечены особенности ультраструктурных механизмов гаметогенеза. Впервые на ультраструктурном уровне изучен процесс сперматогенеза и оогенеза двух видов камбал - япономорской палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой *H. (Cleisthenes) herzensteini*. Также впервые изучены процессы посленерестовой резорбции мужских половых гамет у *H. (Hippoglossoides) dubius* и *H. (Cleisthenes) herzensteini*.

Теоретическое и практическое значение работы. Предложенный способ анализа ультраструктурной организации и дифференциации мужских и женских половых клеток в перспективе позволит корректировать и уточнять схемы таксономической иерархии рыб и выяснять родственные отношения между филогенетическими группами и видами.

Апробация работы. Материалы были представлены на IV, VI и VII Региональных конференциях по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии (Владивосток, 2001, 2003, 2004), на Международном симпозиуме по проблемам мейоза (Санкт-Петербург, 2003), на ежегодной конференции ИБМ ДВО РАН 2005 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы (292 источников, из которых 186 на иностранном языке), проиллюстрирована 1 графиком, 5 схемами, 4 таблицами, 16 микрофотографиями и 84 электронограммами. Общий объем работы 116 страниц.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своим научным руководителям: д.б.н., ведущему научному сотруднику А.А. Реунову, д.б.н., профессору В.Н. Иванкову за помощь и постоянную поддержку в работе, а также директору ИБМ ДВО РАН академику В.Л. Касьянову за предоставленную возможность выполнения исследований в Институте биологии моря. Большое спасибо, сотрудникам лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН, к.б.н. О.Г. Шевченко, Д.В. Фомину за консультации, моральную поддержку, помощь в обработке материала и проведении электронно-микроскопических исследований. Я также признательна сотрудникам лаборатории биологии прибрежных вод ТИНРО-центра за помощь в сборе материала.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. КРАТКИЙ ОБЗОР БИОЛОГИИ И МОРФОЛОГИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА HIPPOGLOSSOIDES. СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ВИДОВ РОДА

Кратко описана история отечественных и зарубежных исследований по распространению, биологии и морфологии представителей рода *Hippoglossoides*. Рассматриваются основные этапы и направления исследований, а также современное систематическое положение видов рода (Норманн, 1934; Щульц, Деляси, 1935; Таранец, 1937; Шабано, 1946; Шмидт, 1950; Моисеев, 1946, 1953; Норман, Вилимовский, 1954; Андрияшев, 1937, 1954; Окада, 1955; Перцева-Остроумова, 1961; Wilimovsky et al., 1967; Forrester et al., 1977; Коваль, Богданов, 1979, 1982; Фадеев, 1984, 1987; Линдберг, Федоров, 1993).

Глава 2. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ГАМЕТОГЕНЕЗЕ КОСТИСТЫХ РЫБ

На основе литературных сведений даны краткое описание половых циклов, характеристика шкал зрелости половых желез рыб.

2.1. Использование особенностей формирования и строения гамет в таксономии костистых рыб

Анализ морфологии и цитохимии оогенеза (особенно в период вителлогенеза) позволил выяснить, что наиболее четкая дифференциация рыб в строении яйцеклеток происходит между таксонами высоких рангов на уровне: отряд, подотряд, семейство. Менее значительные, но достаточно существенные различия отмечены в организации ооцинов у рыб таких таксонов, как подсемейство, род, вид (Иванков, 1987; Дроздов, Иванков, 2000). Однако, типы развития половых клеток изучены не для всех групп костистых рыб. Надо отметить, что данные об ультраструктурных механизмах оогенеза к

решению таксономических задач привлечены впервые. Исследование дифференциации женских половых клеток с применением методов электронной микроскопии представляется перспективным направлением в современной кладистике рыб.

Несмотря на то, что сперматогенез и сперматозоиды изучены у большого количества представителей рыб, какие-либо рекомендации, сделанные на основе сравнительного анализа сперматогенных клеток, отсутствуют. Как показали наши предварительные данные (Незнамова и др., 2003; Реунов и др., 2004), такие аспекты сперматогенеза рыб, как строение вспомогательных клеток, особенности спермиогенеза и резорбции спермиев, могут иметь существенные различия и могут быть использованы как дополнительные таксономические признаки. Из-за отсутствия в литературе метода использования ультраструктурных особенностей дифференциации мужских гамет, дальнейшее развитие данного направления представляется перспективным.

2.2. Сперматогенез

Общие представления о периодах созревания и развития мужских половых клеток, строения семенников, а также строения вспомогательных клеток.

2.3. Оогенез

Общие представления о периодах созревания и развития женских половых клеток, а также строения вспомогательных клеток.

Глава 3. КРАТКАЯ ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Представители двух групп палтусовидных камбал - япономорская палтусовидная *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовая *H. (Cleisthenes) herzensteini*, обитают и нерестятся в заливе П. Великого. На основе литературных сведений дана характеристика основных течений и водных масс Японского моря, проведен анализ особенностей гидрохимических и климатических условий акватории.

Глава 4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В основу работы положен материал, собранный автором в весенне - летний период 2001-2003 гг. Большая часть материала собрана в Уссурийском, Амурском заливах (зал. Петра Великого, Японское море), а также в бухте Патркл. Отлов рыб проводился тралями, ставными неводами, удочками. После отлова проводили биологический анализ рыб, для суждения о репродуктивном состоянии рыб использовали визуальное определение степени зрелости гонад самцов и самок камбал по шестибальной шкале, модифицированной для порционно нерестящихся рыб (Правдин, 1966).

4.1. Гистологические исследования

Для оценки общего состояния гонад самцов и самок палтусовидной и остроголовой камбал использовали полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим. Срезы изучали под микроскопом Polyvar. В работе для светооптических исследований также использовали препараты, любезно предоставленные В. Н. Иванковым

4.2. Электронно-микроскопические исследования

Для электронно-микроскопических исследований кусочки гонад самцов и самок палтусовидной *H. (H.) dubius* и остроголовой *H. (C.) herzensteini* камбал фиксировали в течение двух часов в 2.5% глутаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4), с постфиксацией в 2% четырехокиси осмия на том же буфере. После обезвоживания в спиртах материал заливали в смолу Аралдит. Срезы получали с применением ультрамикротомы Reichert-E, отконтрастированы водным уранил-ацетатом в течение 20 мин. и водным цитратом свинца в течение 2 мин. Полученные срезы исследованы и сфотографированы с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100В.

4.3. Морфометрическое исследование

Фрагменты семенников и яичников от каждой особи исследуемых видов были залиты в отдельный блок. С каждого блока получали по три бленды и по пять серийных срезов с каждой. На каждом срезе изучали по десять сперматогенных и оогенных клеток, по десять ранних оогониев, ооцитов и по три поздних половых клетки. Для каждого объекта подсчитывали общее количество структур и их количественное распределение на один срез клетки. В ооцитах подсчитывали образование желточных гранул на 90 срезах клеток. Полученные данные обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Глава 5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

5.1. Сперматогонии и сперматоциты

Япономорская палтусовидная камбала

Первичные сперматогонии, имеют большое округлое ядро, с диффузным, равномерно распределенным по ядру хроматином и отчетливо очерченным ядрышком. Их диаметр 8 - 10.5 мкм. В цитоплазме присутствуют электронно-плотные структуры, состоящие из рыхлого материала, не окруженные мембраной, которые мы характеризуем как вещество зародышевой плазмы, или половые детерминанты. Митохондрии (диаметр 0.3 мкм) имеют овальную форму, прозрачный матрикс с большим количеством крист. Аппарат Гольджи представлен отдельными диктиосомами состоящим из 6 цистерн. Сперматоциты практически одного размера со сперматогониями, их диаметр 10.5 мкм. На

стадии пахинемы можно наблюдать образование синаптомемальных комплексов – маркеров первичных сперматоцитов. В цитоплазме располагаются различной величины, неправильной формы митохондрии, диаметром 0.5 – 0.7 мкм. Рядом с комплексом Гольджи находятся центриоли.

Остроголовая камбала

Сперматогонии имеют большое округлое ядро, с диффузным, равномерно распределенным по ядру хроматином и отчетливо очерченным ядрышком. Средний диаметр гониев 6 мкм. Присутствуют электронно-плотные структуры, состоящие из рыхлого материала, не окруженные мембраной, которые мы характеризуем как вещество зародышевой плазмы, или половые детерминанты. Митохондрии имеют округлую форму и прозрачный матрикс с незначительным количеством крист 0.4 – 0.5 мкм. Первичные сперматоциты меньше сперматогониев. Диаметр их 4.5 мкм. На стадии пахинемы можно наблюдать образование синаптомемальных комплексов – маркеров первичных сперматоцитов. В цитоплазме располагаются мелкие и крупные различной, чаще овальной формы митохондрии (диаметром 0.4 – 0.5 мкм).

5.2. Сперматиды

Япономорская палтусовидная камбала

Ранние сперматиды имеют диаметр от 2 до 5.5 мкм. Форма ядра округлая, с конденсированным хроматином. Митохондрии располагаются по всему объему цитоплазмы, вокруг ядра, их диаметр 0.4 – 0.6 мкм. Центриольный аппарат находится в базальной ямке. От ядра отпочковывается большое число вакуолей, некоторые из них содержат плотные компоненты. По мере конденсации хроматина и уменьшения объема ядра митохондрии начинают группироваться в средней части спермия.

Остроголовая камбала

Ранние сперматиды овальные, с равномерно конденсированным хроматином, размеры 3 - 3.5 мкм. Цитоплазма содержит мелкие, расположенные по всему объему митохондрии (диаметр 0.4 – 0.5 мкм), цистерны эндоплазматического ретикулума, излишки ядерной оболочки в виде пузырьков. Центриольный аппарат расположен в базальной ямке и связан с системой, цитоплазматических микротрубочек, охватывающей ядро с двух сторон. По мере конденсации хроматина и уменьшения объема ядра митохондрии начинают группироваться в средней части сперматиды. В цитоплазме сперматиды находится комплекс Гольджи, в котором формируется проакросомная везикула, сохраняющаяся на более поздней стадии конденсации хроматина и исчезающая при образовании спермия.

5.3. Строение спермиев

Япономорская палтусовидная камбала

Спермии имеют пулеобразную форму головки и длинный жгутик (рис. 1А). Общая длина головки 2.2 мкм. В головке содержится ядро, заполненное электронно-плотным хроматином. Длина ядра 1.9 - 2 мкм. Ширина ядра 1.2 – 1.3 мкм. Средняя часть спермия - 0.3 мкм. В базальной части ядра имеется инвагинация включающая в себя проксимальную и дистальную центриоли – центриольная ямка, протяженностью 0.5 мкм. Центриоли располагаются в ней под углом друг к другу (рис. 1Б). Центриольный аппарат расположен симметрично в ядерном углублении (рис. 1Б, В) и окружен кольцом из восьми сферических митохондрий, с пластинчатыми кристами беспорядочно расположенными в электронно-прозрачном матриксе, диаметр митохондрий 0.2 – 0.3 мкм (рис. 1Г). Дистальная центриоль является базальным тельцем жгутика спермия, имеющего типичную структуру из девяти периферических и двух центральных пар микротрубочек, одетых цитоплазматическим чехлом. Диаметр жгутика 0.2 мкм. Средняя часть отделена от жгутика слоем цитоплазмы.

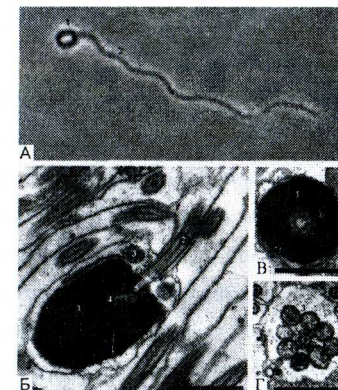


Рис.1. Сперматозоид япономорской палтусовидной камбалы.

1 – ядро; 2 – жгутик; 3 – митохондрии; 4 – проксимальная центриоль; 5 – дистальная центриоль; 6 – аксонема. Масштаб 1 мкм.

Остроголовая камбала

Спермии имеют колоколообразную форму головки, с электронно-плотным ядром и длинный жгутик (рис. 2А, Б). Общая длина головки 1.8 мкм, ядра 1.5 – 1.6 мкм, ширина ядра 1.2 – 1.4 мкм, средняя часть спермия 0.4 мкм. В основании ядро образует глубокое впячивание – центриольную ямку, простирающееся до его середины (рис. 2Б, В). Центриольный аппарат погружен в центриольную ямку. Проксимальная центриоль располагается на одной оси с базальным тельцем и также ориентированна (рис. 2Б). Митохондриальное кольцо состоит из шести митохондрий с пластинчатыми кристами,

диаметром 0.3 – 0.4 мкм (рис.2Г). Аксонема имеет типичное строение, описываемое формулой 9+2 и окружена мембраной (рис.2Г).

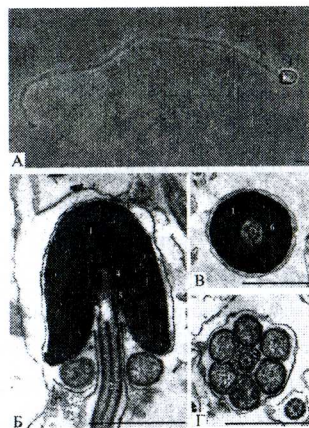


Рис. 2. Сперматозоид остроголовой камбалы

1 – ядро; 2 – жгутик; 3 – митохондрии; 4 – проксимальная центриоль; 5 – дистальная центриоль; 6 – аксонема. Масштаб 1 мкм.

5.4. Вспомогательные клетки

Япономорская палтусовидная камбала

Фолликулярная клетка поляризована, большинство органелл находится в базальной части, тогда как в апикальной части их практически нет. Базальная цитоплазма клетки содержит крупное ядро неправильной формы, хотя нередко встречаются ядра округлой формы. В базальной части располагаются диктиосомы аппарата Гольджи, состоящие из стопки плоских цистерн с расширенными концами и многочисленных мелких вакуолей. Как правило, боковые и базальные поверхности клеточной мембраны образуют неглубокие складки. Цитоплазма клеток электронно-прозрачная. Апикальная цитоплазма содержит многочисленные пузырьки гладкого эндоплазматического ретикулаума, заполненных гомогенным материалом средней электронной плотности. В цитоплазме располагаются небольшие лизосомоподобные тельца (0.2 – 0.4 мкм). Митохондрии представлены самой разнообразной формой, от округлой до лопастевидной, чаще овальной (размеры 0.3 – 0.5 мкм). В цитоплазме находятся многочисленные вакуоли, наполненные хлопьевидным материалом различной электронной плотности. Иногда в цитоплазме можно наблюдать везикулярные тельца небольших размеров в виде плотных, спирально скрученных мембран со светлым в центральной части матриксом. Вся цитоплазма клетки пронизана многочисленными микротрубочками и микрофиламентами. Располагаются эти структуры равномерно по всей цитоплазме.

Остроголовая камбала

Вспомогательные клетки, формирующие стенки фолликулов, имеют вытянутую, уплощенную форму. Как правило, стенка фолликула организована слоем нескольких, как бы налегающих друг на друга клеток, содержащих ядра характерной овально-лопастной формы. Вся цитоплазма клетки пронизана многочисленными микротрубочками и микрофиламентами. Изредка встречаются небольшие лизосомоподобные тельца, в виде округлых мембранных пузырьков диаметром 0.3 – 0.5 мкм, с гомогенным электронноплотным матриксом. Митохондрии имеют округлую, изредка неправильно-овальную форму. В плотном, зернистом матриксе митохондрий хорошо различимы пластинчатые кристы, ориентированные произвольным образом 0.3 – 0.6 мкм. Шероховатый эндоплазматический ретикулум представлен многочисленными трубочками, параллельно расположенными в цитоплазме клетки. Гладкий эндоплазматический ретикулум состоит из многочисленных цистерн.

5.5. Резорбция спермиев

Япономорская палтусовидная камбала

В мужских гонадах отнерестившихся особей присутствует некоторое количество не выметанных сперматозоидов, которые подвергаются постепенной деструкции, сопровождаемой фагоцитарной активностью фолликулярных клеток. Преддеструктивный сперматозоид имеет строение, типичное для нормальных гамет; ядро сохраняет целостность и заполнено электронно-плотным хроматином; наблюдается нормальная локализация центриолей и митохондрий в средней части. Единственным признаком, который можно отнести к видимым ультраструктурным повреждениям, является разрыв клеточной мембраны, которому предшествует ее набухание, которое наблюдается как в области головки, так и в зоне жгутика. Разрывы клеточных мембран сопровождаются отделением мембранных участков от сперматозоидов, в результате чего можно наблюдать мужские гаметы, только частично окруженные мембраной. Потеря мембранных участков сперматозоидами приводит к появлению в полости гонады закрученных мембранных конгломератов, формирующихся путем объединения "блуждающих" мембранных фрагментов. Данные конгломераты обычно расположены вблизи спермиев. Довольно часто можно наблюдать явление захвата сперматозоидов мембранными конгломератами и это приводит к тому, что мужские гаметы оказываются заключенными внутри них. Сперматозоиды, "обмотанные" мембранами, фагоцитируются фолликулярными клетками, в результате чего их часто можно наблюдать в цитоплазме данных клеток. Резорбция фагоцитированных гамет сопровождается появлением остаточных телец, скопления которых в избытке присутствуют в фолликулярных клетках.

Остроголовая камбала

У этого вида остаточные сперматозоиды, присутствующие в гонадах отнерестившихся особей, подвергаются деструкции, происходящей путем самораспада гамет. На начальном этапе наблюдается набухание клеточной мембраны, одновременно с которым в ядре появляются электронно-светлые участки. Впоследствии происходит разрыв клеточной мембраны с отделением ее фрагментов от сперматозоида. Наблюдается прогрессирующая фрагментация хроматина, в результате чего ядро сначала распадается на глобулоподобные продолговатые фрагменты. Хроматин ядер в последующей стадии распада имеет вид мелкодиспергированного материала. В средней части сперматозоидов, которые не имеют клеточных мембран, отмечается рассредоточение митохондрий. Поперечные и продольные срезы позволяют идентифицировать явление продольного расслоения жгутиков. При исследовании распавшихся жгутиков на поперечных срезах можно наблюдать, что характерным признаком нарушения аксонемальной структуры является разделение половин, состоящих из четырех и пяти дублетов микротрубочек. В полости гонады отмечается тенденция к группированию мембранных фрагментов, отделившихся от сперматозоидов. Как правило, происходит закручивание таких мембранных скоплений, сопровождаемое вовлечением в центр мембранного конгломерата частиц распавшихся сперматозоидов, уплотненная субстанция которых приобретает вид остаточного тельца. Сформированные остаточные тельца представлены в виде электронно-плотных тел, имеющих концентрическую структуру. Наши наблюдения показывают, что фолликулярные клетки, выстилающие гонаду тонким одноклеточным слоем, не принимают участия в фагоцитировании образующихся остаточных телец.

Глава 6. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ООГЕНЕЗА

6.1. Превителлогенез

Япономорская палтусовидная камбала

В ооцитах начала превителлогенеза отмечается зональность в расположении органоидов цитоплазмы. Перинуклеарная зона цитоплазмы практически не содержит включений, кроме nuage-материала с примыкающими к нему митохондриями (0.3 – 0.5 мкм). Митохондрии часто приобретают неправильную форму за счет вздутия одной или нескольких крист; иногда внутренняя или внешняя мембрана разрушается. Митохондрия тогда теряет целостность, или превращается в подобие мультивезикулярного тельца. Эндоплазматическая сеть представлена в основном элементами гладкого ретикулума. Аппарат Гольджи представлен отдельными диктиосомами, каждая из которых состоит из 3-5 цистерн. На самом краю ооцита находятся вакуоли диаметром 0.5 – 1 мкм,

содержащие коагулят, ограниченные клеточной мембраной и образованные эндоплазматическим ретикуломом. На поверхности ооцитов диаметром от 150 мкм, образуются микроворсинки длиной 0.75 мкм и толщиной 0.5 мкм

Остроголовая камбала

В ооцитах в период фазы превителлогенеза митохондрии занимают преимущественно околядерное положение, они часто имеют вытянутую овальную форму и достигают диаметра 0.5 – 1.5 мкм. К ядерной оболочке примыкают скопления nuage-материала. В цитоплазме ооцита наблюдаются, наряду со свободными рибосомами, цепочки полисом. Цитоплазма яйцеклетки заполнена множеством пузырьков гладкого эндоплазматического ретикулума. В аппарате Гольджи количество цистерн в составе диктиосомы – 6 – 7. В ходе дальнейшего развития число митохондрий увеличивается, они равномерно распределяются по всей цитоплазме. На периферии ооцита располагаются небольшие вакуоли, всегда заполненные коагулятом и ограниченные мембраной, а также гранулы шероховатого эндоплазматического ретикулума. Встречаются мультиламеллярные тельца, образующиеся из разрушающихся митохондрий. На поверхности ооцитов диаметром от 80 мкм, образуются микроворсинки длиной 0.5 мкм и толщиной 0.3 мкм.

6.2. Вителлогенез

Япономорская палтусовидная камбала

Электронно-микроскопическое исследование показывает, что матрикс цитоплазмы начала вителлогенеза заполнен большим количеством митохондрий различных размеров, присутствует большое количество свободных рибосом. Первые небольшие электронно-плотные включения желтого материала появляются в матриксе митохондрий, впоследствии полностью заполняющем пространство митохондрий. Размер митохондрий 1.5 мкм. Митохондрии лежащие под оболочкой мелкие, округлой или овальной формы с непрозрачным матриксом. Вакуоли на этой стадии двух типов - небольшие, около 3 – 3.5 мкм, заполненные довольно плотным зернистым содержимым, и крупные вакуоли с электронно-прозрачным матриксом в окружении мелких митохондрий. В матриксе цитоплазмы присутствуют мультивезикулярные тельца, вероятно образованные из митохондрий и содержащие зернистый матрикс.

Остроголовая камбала

В начале вителлогенеза в цитоплазме ооцитов наблюдается большое количество митохондрий различной форм и размеров (диаметр 0.2 – 1 мкм). Под оболочкой ооцита располагаются митохондрии палочковидной формы, их размер 1 – 2 мкм, ближе к ядру ооцита присутствуют небольшие округлые митохондрии размером 0.2 мкм. Вакуоли образованы цистернами эндоплазматического ретикулума, содержат электронно-

прозрачный коагулят, их размер 1.5 – 2 мкм. Накопление желточного материала происходит в вакуолях путем слияния более мелких гранул коагулята с крупными. Многие вакуоли не имеют мембранной оболочки. В цитоплазме также присутствует аппарат Гольджи имеющий форму дуги. В цитоплазме ооцита образуется с участием цистерн эндоплазматического ретикулума мультипластинчатое тело. В дальнейшем происходит слияние крупных желточных гранул с более мелкими гранулами.

6.3. Строение оболочек ооцитов

Японская палтусовидная камбала

Толщина оболочки ооцита 6 – 6.5 мкм. По мере созревания ооцита лучистая оболочка становится двухслойной, а потом трехслойной. Внутренний и внешний слои примерно одинаковы по ширине. Внутренний слой состоит из ряда пластин или ламелл, средний и внешний слои не структурированы, радиальные каналцы пронизывают её насквозь. Рис. 3А.

Остроголовая камбала

По мере развития ооцита количество микрослоев составляющих оболочку увеличивается, она утолщается. Так как микрослои по своей структуре одинаковы, то можно полагать, что оболочка ооцита монослойная, толщина оболочки 5.5 – 6 мкм. Рис. 3Б.

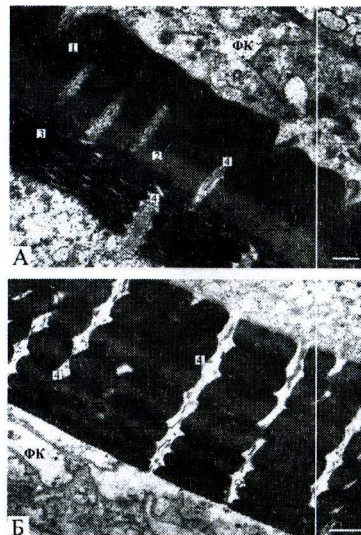


Рис. 3. Оболочки японской палтусовидной (А), остроголовой камбалы (Б).

1 – наружный, 2 – средний, 3 – внутренний слои оболочки; 4 – каналцы; ФК – фолликулярная клетка. Масштаб 1 мкм.

Глава 7. ОБСУЖДЕНИЕ

7.1. Сравнительный анализ фолликулярных клеток в семенниках

Исследование сперматогенного эпителия семенников палтусовидной и остроголовой камбалы показало существование различных морфотипов вспомогательных клеток у этих видов. Вспомогательные клетки, обнаруженные у *H. (Hippoglossoides) dubius*, по структурной организации соответствуют таковым, описанным у других видов костистых рыб, (Nicholls, Graham, 1972; Gresik et al., 1973; Audy, 1978; Loir, 1990b). Тип фолликулярных клеток остроголовой камбалы (см. разд. 5.4) ранее не был описан ни у одного из представителей костистых рыб, и по-видимому, должен быть приведен, как новая разновидность клеток данного типа. Существование различных типов вспомогательных клеток у представителей филогенетически близких таксонов присуще, по-видимому, не только костистым рыбам, но и другим многоклеточным животным. Так, например, два типа вспомогательных клеток было недавно обнаружено у голотурий, что позволило авторам (Reunov et al., 2001) сделать предположение о применимости исследований фолликулярных клеток в качестве структур, сравнительное изучение которых важно при выяснении филогении Holothuroidea наряду с особенностями строения гамет.

7.2. Сравнение особенностей сперматогенеза камбал

Анализ морфологии развивающихся мужских половых клеток палтусовидной *H. (Hippoglossoides) dubius* и остроголовой камбалы *H. (Cleisthenes) herzensteini* позволил выяснить, что на стадии сперматогоний в строении как элементов зародышевой плазмы, так и в особенностях организации ядра и других органоидов различий не обнаружено. Сперматиды японской палтусовидной и остроголовой камбалы также подобны. Для сперматид характерны ярко выраженные видовые особенности дифференциации. Так, у остроголовой камбалы центрилярный аппарат ранней сперматиды связан с системой микротрубочек, по-видимому принимающих участие в морфогенезе клетки. У палтусовидной камбалы микротрубочки в сперматиде не найдены. Отсутствие микротрубочек у палтусовидной камбалы не является артефактом, так как оба типа спермиогенеза (микротрубочковый и безмикротрубочковый) известны у многоклеточных животных (Hodgson, 1992; Реунов, Чернышев, 1992; Reunov, Rice, 1993; Reunov, Klepal, 1997 и др.). Как было отмечено в обзоре литературы, в раннем спермиогенезе некоторых видов костистых рыб наблюдаются начальные стадии формирования акросомной вакуоли, которая постепенно регрессирует (Mattei, Mattei, 1978; Billard, 1983). Интересно то, что формирование подобной вакуоли происходит и в сперматиде остроголовой камбалы, тогда как у палтусовидной камбалы структуры, сравнимые с остаточной акросомой не

найлены. Показано, что акросомоподобная структура возникает путем расширения одной из диктиосом комплекса Гольджи. Однако, в процессе спермиогенеза происходит ее элиминация из цитоплазмы, в результате чего спермий является безакросомным. Сперматозонды япономорской палтусовидной и остроголовой камбал имеют практически одинаковые размеры, различаются формой головки спермия, положением центриолей по отношению друг к другу и количеством митохондрий в митохондриальном кольце.

7.3. Сравнительный анализ резорбции сперматозондов в семенниках

У палтусовидной камбалы функцию посленерестовой очистки гонады выполняют фолликулярные клетки, фагоцитирующие и резорбирующие сперматозонды, что характерно для костистых рыб (Billard et al., 1972; Nicholls, Graham, 1972; Gresik et al., 1973; Guraya, 1976; Nagahama et al., 1978; Kerr et al., 1980; Grier et al., 1980; Grier, 1981; Nagahama et al., 1982; Soley, Vuren, 1984; Kretser, 1988; Grier et al., 1989; Dudois, Callard, 1989; Максимович, 2002) и других представителей многоклеточных животных (Рузен-Ранге, 1980; Buckland-Nicks, Chia, 1986; Sakai, Yamashina, 1989; Cavey, Märkel, 1994; Jørgensen, Lützen, 1997). Дополнением к традиционному способу фагоцитирования гамет, обнаруженным у палтусовидной камбалы, является предварительная мембранная "упаковка" спермиев, подлежащих фагоцитозу. Эта особенность ранее не была обнаружена у костистых рыб, впервые обнаружена и является видоспецифичной для *H. (Hippoglossoides) dubius*. У остроголовой камбалы деструкция гамет происходит способом, не описанным ранее для костистых рыб. Данный процесс происходит без участия фолликулярных клеток и может быть охарактеризован как самораспад, сопровождаемый фрагментацией хроматина, аксонемальных структур и выходом митохондрий в полость гонады. Вероятно, наблюдается автолитический паттерн клеточной деградациии (Хотимченко и др., 1993), сопровождаемый активизацией гидролаз, обеспечивающих структурную фрагментацию хроматина и клетки в целом. Считается (Clarke 1990; Majno, Joris, 1995; Huppertz et al., 1999), что фрагментация ядерного материала является первичным проявлением программной клеточной смерти – апоптоза, реализацию которой обеспечивают ферменты "каспазы". Существуют и другие способы клеточной деструкции, обеспечиваемые группами пока неизученных генов (Clarke, 1990; Vaux, Korsmeyer, 1999), поэтому распад гамет теоретически может происходить неапоптотическим способом.

7.4. Сравнение особенностей оогенеза и яйцевых оболочек камбал

В превителлогенных ооцитах япономорской палтусовидной и остроголовой камбал происходят характерные изменения органелл, сходные как у других видов костистых рыб, так и у *H. (Hippoglossoides) dubius*. и *H. (Cleithrenes) herzensteini* (Yamamoto, Onozato, 1965; Ulrich, 1969; Озернюк, Пальмбах, 1974; Емельянова, 1979; Brusle, 1980; Selman et al.,

1993; Чмилевский, Каменева, 2001). Отличительной особенностью морфологии ооцитов исследованных видов является отсутствие желточного ядра (Равен, 1964). В ооцитах периода вителлогенеза обнаружены различия в способах формирования желтка (рис. 4). В ооцитах палтусовидной и остроголовой камбал, как у многих видов костистых рыб, различают два вида желточных зерен – эндогенного и экзогенного происхождения. В ооцитах остроголовой камбалы желточный материал накапливается в вакуолях, образованных эндоплазматическим ретикуломом. Желточный материал представляет собой неоднородные глобулы состоящие из мелких зернистых включений (рис. 4А). В ооцитах палтусовидной камбалы желточные зерна эндогенного происхождения образуются при участии митохондрий (рис. 4Б). Подобное образование желточных зерен отмечено для золотой рыбки, а также отмечено для осетровых (Yamamoto, Onozato, 1965; Райкова, 1973). В ооцитах мозамбикской тилапии накопление желтка происходит также при участии митохондрий, преобразующихся в кольцевидные структуры (Чмилевский, Каменева, 2003). У данио *Brachydanio rerio* эндогенный желток формируется при участии шероховатого эндоплазматического ретикула (Ulrich, 1969). У изученных видов камбал желточные гранулы образуются в цистернах эндоплазматического ретикула, имеют зернистое строение и окружены мембраной.

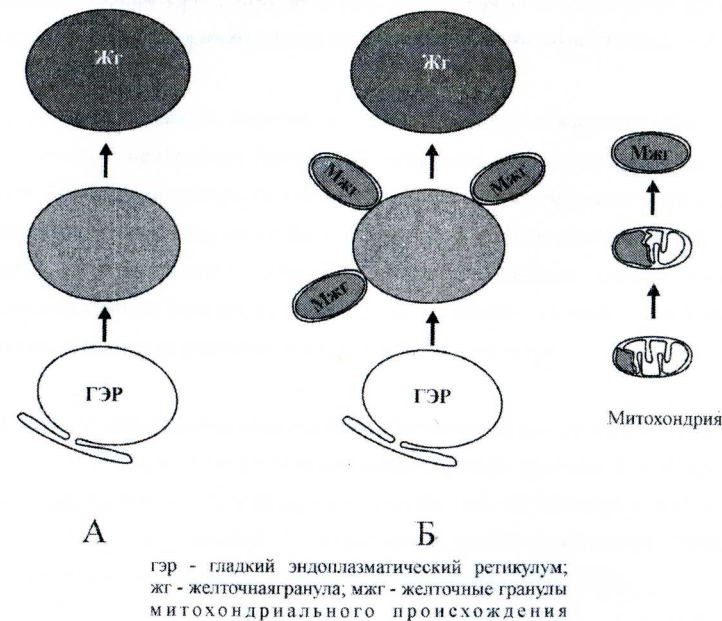


Рис. 4. Схематическое изображение образования желтка в ооцитах остроголовой (А) и япономорской палтусовидной (Б)

С переходом к фазе интенсивного желткообразования поступление вителлогенина увеличивается, об этом свидетельствует большое количество окаймленных пиноцитозных пузырьков и мелких желточных зерен. Окаймленные пиноцитозные пузырьки и избирательное включение вителлогенина отмечены авторами, изучавшими оогенез костистых рыб (Ulrich, 1969; Wallace, Selman, 1981; Selman, Wallace, 1983; Tyler et al., 1987). Образование экзогенного желтка в ооцитах палтусовидной камбалы можно объяснить используя схему Опрешко с соавторами (Opreshko et al., 1980) для ксенопуса, а так же результаты Йошизаки (Yoshizaki, 1992).

Ооциты япономорской палтусовидной отличаются от ооцитов остроголовой камбалы размерами, изменчивостью и размерами вакуолей, желточных гранул и глобул, строением оболочек, а также формированием желточных зерен.

Данные различия дополняют перечень ранее полученных критериев, на основании которых становится очевидной необходимость пересмотра принадлежности *H. (C.) herzensteini* к роду *Hippoglossoides* и выведении рода *Cleisthes* в самостоятельный таксон. Полученные результаты показывают целесообразность и перспективность ультраструктурных исследований гамет для выяснения родственных отношений и таксономического положения различных групп и отдельных видов рыб.

ВЫВОДЫ

1. Метод ультраструктурного анализа дифференциации гамет показал, что для исследованных видов камбал характерно определенное строение и функционирование половых клеток, структурные характеристики которых можно использовать в таксономии для характеристики таксонов. Дальнейшее развитие данного метода представляется перспективным.
2. Отмечены существенные различия в ультраструктурных особенностях спермиогенеза. У остроголовой камбалы в фазах морфогенеза сперматид участвуют микротрубочки и происходит формирование акросомоподобной везикулы, чего не наблюдается в сперматиде япономорской палтусовидной камбалы. Изученные виды отличаются формой головки спермия и строением центриольного аппарата.
3. Фолликулярные клетки, участвующие в гаметогенезе исследованных камбал, отличаются формой и размерами. Для япономорской палтусовидной камбалы характерны фолликулярные клетки округлой формы и крупного размера, у остроголовой камбалы они небольшие и уплощенной формы.
4. В процессе резорбции спермиев обоих видов впервые обнаружено внеклеточное функционирование мембранных фрагментов, «обматывающих» структуры, подлежащие резорбции. Однако, у япономорской палтусовидной камбалы в мембранные конгломераты заключаются сперматозоиды, тогда как у остроголовой камбалы упаковке подвергаются фрагменты автолизированных гамет. Резорбция упакованных сперматозоидов у палтусовидной камбалы происходит в фолликулярных клетках, а у остроголовой камбалы фолликулярные клетки не участвуют в утилизации остаточных тел.
5. В процессе оогенеза отмечены различия в способах образования желточных гранул в период вителлогенеза. У япономорской палтусовидной камбалы в формировании желточных гранул принимают участие митохондрии, чего не отмечено у остроголовой камбалы. Ооциты палтусовидной и остроголовой камбал различаются размерами, степенью изменчивости и размерами вакуолей, желточных зерен и глобул.

6. Обнаружено различие в строении оболочек яйцеклеток. В период позднего вителлогенеза оболочка ооцита япономорской палтусовидной камбалы становится трехслойной, у остроголовой остается однослойной.

7. Существенные различия, отмеченные при исследовании оогенеза и сперматогенеза дополняют перечень критериев, на основании которых близкое родство япономорской палтусовидной и остроголовой камбал подвергается сомнению и показывает необходимость пересмотра принадлежности остроголовой камбалы к роду *Hippoglossoides* и выведения рода *Cleisthenes* (остроголовые камбалы) в самостоятельный таксон.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Сравнительное исследование вспомогательных клеток в семенниках *Glyptocephalus stelleri* Cottsche и *Pleuronectes pinnifasciatus* Kner (Teleostei, Pleuronectidae) // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 1. С. 1-3.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Ультраструктурное исследование постнерестовой деструкции мужских гамет у остроголовой камбалы *Hippoglossoides herzensteini* (Teleostei, Pleuronectidae) и кеты *Oncorhynchus keta* (Teleostei, Salmonidae), как представителей морских и анадромных костистых рыб // Биология моря. 2005. Т. 31. № 2. С. 115-118.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. Сравнительное исследование постнерестовой деструкции сперматозоидов у камбаловых рыб *Hippoglossoides (Cleisthenes) herzensteini* и *Hippoglossoides dubius* (Teleostei, Pleuronectidae) // Цитология. 2004. Т. 46. № 8. С. 704-709.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Александрова Я.Н., Исаева В.В. Ультраструктурное исследование взаимодействия герминативных гранул и митохондрий у *Apostichopus japonicus* (Echinodermata, Holothuroidea) и *Pleuronectes asper* (Teleostei, Pleuronectidae) // Биология моря. 2004. Т. 30. № 3. С. 244-246.

Винников К.А., Иванков В.Н., Незнанова С.Ю., Реунов А.А., Борисовец Е.Э., Питрук Д.Л. Таксономический статус и родовая принадлежность япономорских камбал (п.сем. *Pleuronectinae*) // VI региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2004. С. 27-29.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. О родовой принадлежности и строении яйцеклеток некоторых видов камбал Японского моря // IV Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2001. С. 87.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Ультраструктурный механизм постнерестовой резорбции у кеты и остроголовой камбалы // Цитология. 2003. Т. 45. С. 904.

Незнанова С.Ю., Иванков В.Н., Реунов А.А. Морфология гамет и систематическое положение палтусовидной *Hippoglossoides dubius* и остроголовой *Cleisthenes herzensteini* камбал (п.сем. *Pleuronectinae*) // V региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2003. С. 64-65.

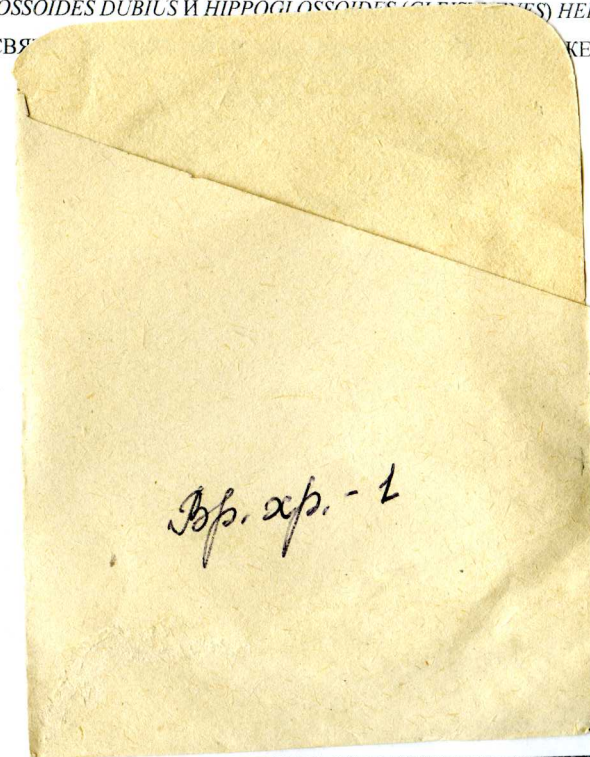
Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия герминальных гранул и митохондрий в гониальных клетках камбалы // Цитология. 2003. Т. 45. С. 919-920.

Реунов А.А., Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. Ультраструктурные механизмы постнерестовой деструкции сперматозоидов остроголовой *Cleisthenes herzensteini* и палтусовидной *Hippoglossoides dubius* камбал // V региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2003. С. 79-80.

Реунов А.А. (ИБМ), Незнанова С.Ю., Иванков В.Н. (ДВГУ) "Ультраструктурное исследование спермиогенеза у камбаловых рыб *Hippoglossoides (Cleisthenes) herzensteini* и *H. dubius (Teleostei, Pleuronectidae)*" // VI региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. Владивосток. Изд. ДВГУ. 2004. С. 98.

НЕЗНАНОВА Светлана Юрьевна

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА КАМБАЛ
HIPPOGLOSSOIDES DUBIUS И *HIPPOGLOSSOIDES (CLEISTHENES) HERZENSTEINI* В
СВЯЗИ С ПРОБЛЕМАМИ ЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ



Подписано в печать 03.05.2006. Формат 60x84/16.

Усл. печ. л. 1. Печать ризограф. Заказ 64. Тираж 100 экз.

Отпечатано с оригинала заказчика в типографии ЧП Ермаков,
г. Владивосток, ул. Адм. Кузнецова, 82.