

✓ УДК 595.384.2

**СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАМЧАТСКОГО КРАБА
(PARALITHODES CAMTSCHATICA TILESIIUS)**

И. А. БАЛАХНИН и И. В. ДРОБНИЦКАЯ

Изучение биологии камчатского краба в значительной мере связано с вопросами промысла и охраны его запасов. В этом плане особое значение приобретает исследование внутривидовых групп краба. Промысел без учета структуры вида может привести к подрыву запасов наиболее малочисленной внутривидовой группировки.¹

Между тем специальных исследований по внутривидовой дифференцировке камчатского краба не проводилось. Существование у западного побережья Камчатки скоплений крабов, мигрирующих в определенных районах, позволяет лишь предполагать наличие таких групп. По данным Л. Г. Виноградова (1941, 1945) и Л. Е. Румянцева (1945), для миграционных групп крабов характерны свои пути перемещения, места и сроки размножения и линьки. В разных районах крабы отличаются различным темпом роста, возрастным составом и размерами (Галкин, 1960).

Результаты мечения показывают, что основная масса крабов не выходит за пределы своего района. Однако нередки случаи, когда часть крабов покидает свой миграционный район. Хайрюзовские крабы (4%) могут находиться за пределами своего ареала, а более 10% Ичинской группы обнаруживаются в более северном Хайрюзовском районе (Виноградов, 1945). Южные миграционные районы (Колпаковский и Озерновский) менее обособлены, и процент крабов, переходящих в смежные стада, здесь еще выше. Известны значительные миграции неполовозрелых особей из северных районов, где осуществляется воспроизводство крабов, на юг, вплоть до Озерновского района. Большое количество крабов передвигается в обратном направлении — с юга на север.

Такая схема взаимообмена свидетельствует об отсутствии постоянного состава особей внутри каждой миграционной группировки. Гидрологический режим и другие факторы, определяющие размах миграций и степень смешения крабов, также оказывают влияние на состав миграционных групп. Все это усложняет задачу по выявлению внутривидовых групп и требует применения комплекса методов. В комплекс вошли и наши исследования серологических свойств сывороток гемолимфы камчатского краба.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал в виде сыворотки гемолимфы камчатского и синего (*Paralithodes platypus*) крабов собран В. И. Чекуновой¹. Данные о количе-

¹ Данные о материале и методике его сбора изложены в настоящем сборнике в статьях В. И. Чекуновой.

стве использованных проб по районам скоплений, обнаруженных В. И. Чекуновой, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Пробы сывороток гемолимфы камчатского и синего крабов, использованных в реакциях преципитации (по районам)

Район	Границы	Условные обозначения	Число камчатского краба	Число синего краба
Озерновский	51°00' — 53°00' с. ш.	I	36	—
Кихчикский	53°00' — 54°00' с. ш.	II	23	—
Колпаковский	54°00' — 55°10' с. ш.	III	53	—
Ичинский	55°10' — 56°50' с. ш.	IV	153	10
Хайрюзовский	севернее 56°50'	V	59	—
Итого			324	10

Для установления внутривидовых различий сывороток камчатских крабов из 5 миграционных районов применен серологический метод с использованием реакции преципитации в агаре (Ougchterlony O, 1949, 1953, 1953a; Абелев Г. И., 1960; Зильбер Л. А. и Абелев Г. И., 1963). Эта реакция широко используется при изучении родственных связей рыб (Закс М. Г. и Соколова М. М., 1961, 1961a; Алтухов Ю. П. и Апекин В. С., 1963; Балахнин И. А., 1964, 1964a; Лиманский В. В., 1964; Ridgway G. J., Klontz G. W., Matsumoto C. 1959 и др.).

Исследования Д. Н. Талиева, А. Я. Базикаловой (1934, 1940) и Лиона (Leone, 1949, 1950) свидетельствуют о возможности применения реакции преципитации для изучения генетических связей у беспозвоночных, в том числе ракообразных. Наконец, в работе Шустера (Schuster,

Таблица 2

Характеристика антигенов и схемы получения преципитирующих сывороток

Обозначения антисывороток	Антиген (сыворотка)					Схема иммунизации							Условное обозначение
	вид краба	район миграции	№ пробы	пол	% белка	неделя	число инъекций за неделю	состав вводимой смеси по компонентам, мл					
								сыворотка	физиологический раствор	стимулятор Фрейнда	0,1% раствор стрихнина		
Ac (17—O)	Камчатский	I	17	Самка	4,38	1	1	0,5	1,5	2,0	—	А	
Ac (21—O)		I	21	Самец	4,01	2	1	1,0	1,0	2,0	—		
Ac (87—K)		III	87	Самец	4,81	3	1	2,0	—	2,0	—		
Ac (119—K)		III	119	Самка	5,62	4	4 по 0,5	0,25	1,75	—	—		
Ac (152—И)		IV	152	Самец	3,94	5	4 по 1 мл	0,5	3,5	—	—		
Ac (173—И)		IV	173	Самка	6,67	6	4 по 2 мл	1,0	7,0	—	—		
Ac (324—X)*	V		324	juv	3,50							Б	
Ac (344—X)*			344	Самец	5,37								
Ac (272—с)*	Синий	IV	272	Самец	4,60								
Ac (1—O)	Камчатский	I	1	Самец	5,43	1	2	0,5	—	—	0,2	Б	
Ac (122—K)*		III	122	Самец	6,08	2	2	1,0	—	—	0,2		
Ac (293—с)*	Синий	IV	293	Самец	5,96	3	1	2,0	—	—	0,2		

Примечание. Антисыворотки, дифференцирующие крабов на группы P+ и P— отмечены знаком *.

1962) сообщается об успешном применении реакций преципитации в жидкой среде и агаре для установления различий между тремя видами крабов из семейства Limulidae.

В качестве антигена взяты сыворотки камчатских крабов из Озерновского, Колпаковского, Ичинского и Хайрюзовского районов, а также сыворотки синего краба (табл. 2).

Количество белка в сыворотках определяли по коэффициенту преломления света рефрактометром ИРФ-22 при температуре $20 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

Для получения антисывороток на белок сыворотки крабов иммунизировали кроликов по схемам, приведенным в табл. 2. В качестве стимулятора в схеме А применен раствор Фрейнда (Freund, 1951, 1956), который вместе с антигеном вводили подкожно. Антиген по схеме Б вводили внутривенно после предварительной стимуляции подопытных животных стрихнином (внутримышечно).

Для наблюдения и фотографирования реакций преципитации в агаре пользовались установкой, сконструированной по типу иллюминатора Клонца, Риджвея и Вильсона (Klontz, Ridgway and Wilson, 1960).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой серии опытов сыворотки камчатских крабов испытаны с девятью антисыворотками, полученными по схеме А.

Каждая проба содержала не менее пяти антигенных компонентов (рис. 1).



Рис. 1. Демонстрация идентичности антигенных компонентов сывороток камчатского краба в реакции с антисывороткой Ас/21—0/.

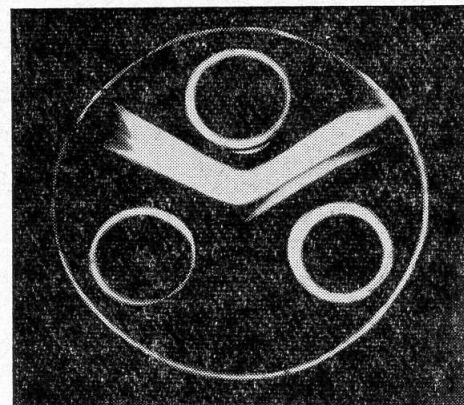


Рис. 2. Демонстрация антигенных различий сывороток крови камчатского краба в реакции с антисывороткой Ас/272-с/. Дополнительная линия преципитации справа образована сывороткой группы P+.

При помощи некоторых антисывороток установлено, что камчатский краб по серологическим свойствам сывороток делится на две группы. Особи одной группы в отличие от другой содержат дополнительный антиген (рис. 2). Этот антиген обозначен буквой Р (от слова Paralithodes), а сывороточные группы крабов соответственно P+ и P—. Подобные группы встречаются также у человека (Прокоп, 1963) и у рыб (Балахнин, 1964а).

В реакциях второй серии опытов испытаны три антисыворотки, приготовленные по схеме Б. Две из них позволили дифференцировать

крабов на те же группы Р+ и Р—. Однако полной серии опытов с этими антисыворотками осуществлено не было, так как они обладали низким титром, и картина различий между группами была менее отчетлива, чем в опытах с антисыворотками Ас(324—Х), Ас(344—Х) и Ас(272—с). Попытка усилить дифференцирующую способность антисывороток путем разведения их не дала желаемых результатов, так как титр анти-Р антител оказался ниже титра всех остальных антител.

Дальнейшие опыты с антисыворотками Ас(344—Х) и Ас(272—с) показали, что камчатские крабы группы Р+ встречаются реже, чем крабы группы Р—, причем представители и тех и других имеются во всех группировках, кроме Озерновской. В Озерновском районе крабы представлены только Р-особями, идентичными Р-особям других районов, так же как идентичны между собой Р+ крабы Кихчикского, Колпаковского, Ичинского и Хайрюзовского районов.

Антисыворотками Ас(344-Х) и Ас(272-с) испытаны 10 особей синего краба. Все особи этого вида оказались Р+. Это свидетельствует о существовании заметных серологических различий между синим и камчатским крабами.

Чтобы этот вывод и последующие положения не вызывали сомнений, необходимо доказательство, что обнаруженные между крабами Р+ и Р— серологические отличия действительно относятся к групповым. Поэтому полученные результаты проанализированы с точки зрения влияния на частоту встречаемости группы Р+ таких важных биологических факторов, как пол, зрелость, возраст, а также содержание белка в сыворотке. Отрицательные результаты такого анализа могли до некоторой степени служить доказательством наличия именно групповых различий.

Дисперсионный анализ показал отсутствие статистически достоверного влияния пола ($F=0$; $\nu_1=1$; $\nu_2=256$), зрелости ($F=0,8$; $\nu_1=1$; $\nu_2=256$), возраста¹ ($F=0,9$; $\nu_1=13$; $\nu_2=310$) и количества белка в сыворотке краба ($F=1,2$; $\nu_1=8$; $\nu_2=315$) на частоту встречаемости Р-фактора.

Теперь не оставалось больших сомнений в том, что обнаруженные группы Р+ и Р— являются сывороточными группами крови. Более того, изучение района миграции на частоту встречаемости Р-фактора показало достоверность этого влияния ($F=2,6$; $\nu_1=4$; $\nu_2=319$) и позволило надеяться на возможность использования обнаруженных серологических признаков для выявления различий между миграционными группировками камчатского краба.

Подсчет частоты встречаемости Р-фактора у крабов различных миграционных группировок показал, что для каждой из них характерна своя частота встречаемости Р+ крабов. Наибольшего значения она достигает в Колпаковском и Ичинском районах, в то время как в Озерновском равна нулю (рис. 3, табл. 3).

Установление различий между миграционными группировками камчатского краба способом «Хи-квадрат» показало, что они статистически

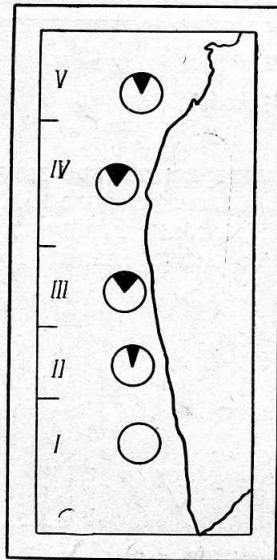


Рис. 3. Географическое распределение Р-фактора сыворотки особей камчатского краба из пяти районов западно-камчатского шельфа. Черным сектором показана доля Р+ крабов.

¹ Возраст крабов определяли по ширине панциря (Виноградов, 1941).

Таблица 3

Частота встречаемости Р-фактора в сыворотках камчатского и синего крабов

Сывороточные группы	Миграционные группы					Камчатский краб	Синий краб
	озерновская	кихчикская	колпаковская	ичинская	хайрюзовская		
Р—	36	21	41	125	51	274	0
Р+	0	2	12	28	8	50	10
Итого	36	23	53	153	59	324	10
%Р+особей	0	8,7	22,6	18,3	13,6	15,4	100

достоверны только между крабами из Озерновского и, с другой стороны, Колпаковского и Ичинского районов (рис. 4).

Различия между двумя видами крабов — синим и камчатским — еще более значительны ($F=55$; $\nu_1=1$; $\nu_2=332$), поскольку частота встречаемости Р-фактора у них соответственно равна 100 и 15,4%.

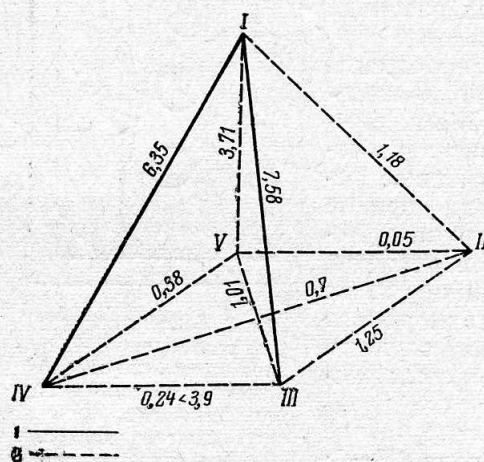


Рис. 4. Результаты сравнения сывороток камчатских крабов пяти миграционных групп по Р-фактору: Обозначения: цифры — значения «Хи-квадрат»; 1 — наличие различий; 2 — отсутствие различий.

Таким образом, результаты серологического анализа проб, собранных весной 1963 г., свидетельствуют о наличии заметных серологических различий между синим и камчатским крабами, а также о существовании у камчатского краба в районе западнокамчатского шельфа не менее двух внутривидовых группировок.

Для получения более достоверных данных о максимальном числе и расположении внутривидовых группировок камчатского краба у западных берегов Камчатки необходим сбор дополнительного материала и проведение исследований на протяжении не менее двух весенних сезонов.

Выводы

1. По серологическим свойствам сывороток камчатский краб разделен на две группы: Р+ и Р—. Крабы группы Р+ встречаются реже, чем крабы группы Р—.

2. Выявлены значительные серологические отличия по частоте встречаемости Р-фактора между синим и камчатским крабами.

3. Обнаружены статистически достоверные различия по частоте встречаемости Р-фактора между крабами из Озерновского и, с другой стороны, Колпаковского и Ичинского районов, которые свидетельствуют о существовании у камчатского краба не менее двух внутривидовых группировок.

4. Для получения данных о числе внутривидовых группировок и их локализации необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

Абелев Г. И. Модификация метода преципитации в агаре для сравнения двух систем антиген — антисыворотка. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 49, № 3, 1960.

Алтухов Ю. П. и Апекин В. С. Серологический анализ родственных взаимоотношений «крупной» и «мелкой» ставриды Черного моря. Вопросы ихтиологии. Т. 3. Вып. 1 (26), 1963.

Балахнин И. А. Опыт применения реакции преципитации для установления родственных связей рыб (лещ Рыбинского водохранилища). Вопросы ихтиологии. Т. 4. Вып. 3 (32), 1964.

Балахнин И. А. Серологичний метод дослідження лящів Дунаю та Дніпра. Тези доповідей і Республіканської конференції Всесоюзного гідробіологічного товариства, стор. 63, Видавництво «Наукова думка», 1964 а.

Виноградов Л. Г. Камчатский краб. ТИПРО. Владивосток, 1941.

Виноградов Л. Г. Годичный цикл и миграции краба в северной части западнокамчатского шельфа. Известия ТИПРО. Т. 19. Владивосток, 1945.

Галкин Ю. И. Акклиматизация и перевозки камчатского краба. Труды Мурманского морского биологического института АН СССР. Вып. 2 (6), Изд-во АН СССР, 1960.

Закс М. Г. и Соколова М. М. Установление различий между отдельными стадами нерки (*Onchorhynchus nerca* Walb.) посредством реакции преципитации. ДАН СССР. Т. 139, № 6, 1961.

Закс М. Г. и Соколова М. М. Иммуно-серологические различия между отдельными стадами нерки. Вопросы ихтиологии. Т. 1. Вып. 4, 1961 а.

Зильбер Л. А. и Абелев Г. И. Иммунология и вирусология рака. Медгиз, 1963.

Лиманский В. В. Анализ внутривидовой дифференциации некоторых рыб Черного и Азовского морей при помощи реакции преципитации. Труды АзчерНИРО. Вып. 22, 1964.

Прокоп О. Группы Gm, Gc и Ag в сыворотке. Судебно-медицинская экспертиза, № 2 и № 3, 1963.

Румянцев Л. Е. Миграции краба у южной части западного побережья Камчатки. Известия ТИПРО. Т. 19, 1945.

Талиев Д. Н. Опыт применения реакции преципитации к познанию происхождения и истории Байкальской фауны. Труды Байкальской лимнологической станции. Т. 10, 1940.

Талиев Д. Н. и Базикалова А. Я. Предварительные результаты сравнения фауны Байкала и Каспия при помощи реакции преципитации. Доклады АН СССР. Т. 2, № 8, 1934.

Freund I. The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. A review. Amer. Journ. Clinic. Pathol. V. 21, N 7, 1951.

Freund I. The mode of actions of immunologic adjuvants. Arch. Tuberc. Res., V. 7, No 130, 1956.

Klontz I. W., Ridgway G. I. and Wilson G. P. An illuminator for observing and photographing precipitin reactions in agar. J. Biolog. Photogr. Ass. V. 28, N 1, 1960.

Leone C. A. Comparative serology of some branchyuran crustacea and studies in hemocyanin correspondence. Biol. Bull. V. 97, N 3, 1949.— Serological systematics of some palinuran and astacuran crustacea. Ibid. V. 98, N 2, 1950.

Öngchterlony Ö. Antigen—antibody reaction in gels. Arkiv Kemie Mineralogy och Geology. V. 26, N 14, 1949.

Öngchterlony Ö. Gel diffusion methods for immunological analysis. Sixth Inter. Cong. of Microbiol. v. 2, 1953.— Antigen—antibody reaction in gels IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta pathologica et Microbiologica Scandinavica. V. 32, N 2, 1953.

Ridgway G. I., Klontz W. and Matsumoto C. Intraspecific differences in the serum antigens of red salmon demonstrated by immunochemical methods. Bureau of Commer. Fish. 1959.

Schuster C. N. Serological correspondence among Horseshoe «Crabs» (Limulidae) Zoologica. V. 47, part. 1, 1962.