

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр
(ФГУП "ТИНРО-центр")

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ

Научная конференция, посвященная
70-летию С.М. Коновалова

25–27 марта 2008 г.



Владивосток
2008

УДК 639.2.053.3

Современное состояние водных биоресурсов : материалы научной конференции, посвященной 70-летию С.М. Коновалова. — Владивосток: ТИНРО-центр, 2008. — 976 с.

ISBN 5-89131-078-3

Сборник докладов научной конференции «Современное состояние водных биоресурсов», посвященной 70-летию С.М. Коновалова, доктора биологических наук, профессора, директора ТИНРО в 1973–1983 гг., содержит материалы по пяти секциям: «Биология и ресурсы морских и пресноводных организмов», «Тихоокеанские лососи в пресноводных, эстуарно-прибрежных и морских экосистемах», «Условия обитания водных организмов», «Искусственное разведение гидробионтов», «Биохимические и биотехнологические аспекты переработки гидробионтов».

ISBN 5-89131-078-3

© Тихоокеанский научно-исследовательский
рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр),
2008

ИЗМЕНЕНИЕ ЦВЕТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ЯИЧНИКАХ ЯПОНСКОГО МОХНАТОРУКОГО КРАБА *ERIOCHEIR JAPONICA* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗРЕЛОСТИ

П.А. Задорожный^{1,2}, М.В. Калинина¹, Н.А. Винникова³

¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, г. Владивосток, Россия, e-mail: kalininamv@tinro.ru

² Институт химии ДВО РАН, г. Владивосток, Россия, e-mail: zadorozhny@mail.ru

³ Дальневосточный государственный университет, г. Владивосток, Россия

Японский мохнаторукий краб *Eriocheir japonica* (de Naan, 1835) широко распространен в реках и эстуарно-прибрежных комплексах северо-восточной части тихоокеанского побережья от Японских островов до Сахалина (Определитель ..., 1995). В настоящее время работы по изучению биологии этого вида в Приморье являются актуальными в связи с возросшим интересом к его промыслу и разведению. Многие исследователи отмечают закономерное изменение цвета яичников мохнаторукого краба по мере их роста (Kobayashi, 2003; и др.). Данный факт известен для многих видов ракообразных. Известно, что гонады ракообразных содержат природные пигменты — каротиноиды, которые в свободном состоянии или в виде нековалентных ассоциатов с белком определяют цвет гонад (Goodwin, 1984).

Целью данной работы является оценка взаимосвязи между стадией зрелости и цветом гонад с изменениями содержания каротиноидов у самок японского мохнаторукого краба.

Самок японского мохнаторукого краба собирали в р. Раздольная Приморского края в 2006–2007 гг. Пол животных определяли по форме абдомена (Kobayashi, Matsuura, 1992).

Кусочки гонады фиксировали в 96 %-ном этиловом спирте и ФСУ, фиксированный материал заливали в парафин по стандартной методике (Ромейс, 1955). Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Препараты просматривали и анализировали под микроскопом LABOVAL 4. Стадии зрелости яичников определяли по классификации, предложенной Кобаяси (Kobayashi, 2003): 1-я — стадия пролиферации оогониев и хромосомных преобразований ооцитов, 2-я — стадия превителлогенеза, 3-я — первичного вителлогенеза, 4-я — вторичного вителлогенеза, 5-я — преднерестовая, 6-я — посленерестовая.

Цвет гонад определяли визуально, используя атлас Манселла (Munsell Book of Color ..., 1976) и следующую шкалу цветов: светло-желтый, желтый, бежевый, светло-фиолетовый, светло-коричневый, коричневый, темно-фиолетовый и темно-коричневый (Калинина и др., 2008), а также инструментально с помощью отражательного колориметра Chroma meter CR-400 (Konica Minolta), источник света С.

Для определения каротиноидов брали образцы гонад самок краба на разных стадиях зрелости. Навеску яичников экстрагировали ацетоном с последующим переводом каротиноидов в гексан (Карнаухов, 1988). Полученный экстракт сушили безводным Na₂SO₄ и подвергали спектрофотометрическому или хроматографическому анализу. Оптическую плотность экстрактов определяли с помощью спектрофотометра «Shimadzu UV-3100», с использованием удельного коэффициента поглощения 250 или 210 мл/см·мг. Хроматографию проводили на прямофазной колонке Zorbax Sil (5 мкм, 250,0×4,6 мм, Du Pont Co Ltd), используя хроматограф «Shimadzu» (насос LC-6A, детектор SPD-M6A), скорость потока элюента 1 мл/мин, детектирование на 450 нм. Каротиноиды разделяли в ступенчатом градиенте растворителей гексан—ацетон в объемных соотношениях 92 : 8 и 8 : 2. Смену элюента проводили на 11 минуте. Для калибровки детектора использовали метод внешнего стандарта. Фракция каротиноидов была выделена из моркови, астаксантин приобретен у Sigma. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft).

На начальных этапах развития (1-я стадия зрелости) яичники окрашены в молочно-белый или светло-желтый (кремовый) цвета. Яичники на 2-й стадии окрашены в различные оттенки желтого цвета (от желтого до бежевого, включая ярко- и грязно-желтый цвета). Го-

нады самок на 3-й стадии окрашены в светло-фиолетовый и светло-коричневый цвета. Яичники, находящиеся в начале 4-й стадии, имеют светло-коричневый цвет, а в конце 4-й стадии — коричневый или темно-фиолетовый цвета. Гонады на 5-й стадии окрашены в темно-фиолетовый и бурый цвета. Цвет яичников на 6-й (посленерестовой) стадии можно условно назвать «бежевый с включениями», поскольку на этой стадии гонады преимущественно заполнены ооцитами малого роста и не выметанными зрелыми ооцитами, которые визуальнo выглядят как мелкие черные вкрапления. Необходимо отметить, что начиная с 3-й стадии, яичники, находящиеся на «соседних» стадиях зрелости, в некоторых случаях имели одинаковый цвет. Например, светло-коричневый цвет встречался у животных, гонады которых находились в конце 3- — начале 4-й стадий, а темно-фиолетовый и коричневый цвета могли принадлежать самкам, гонады которых находились на 4- и 5-й стадиях.

Учитывая субъективность словесных описаний цвета, была проведена инструментальная и визуальная оценка цвета гонад с помощью отражательного колориметра и атласа цветов Манселла, что позволило получить точные и объективные результаты измерения цвета. В первом случае цвет измеряли в системе $L^*a^*b^*$, где L^* — светлота, a^* — краснота, учитывающая изменение цветового стимула от зеленого до красного, b^* — желтизна, учитывающая изменение цветового стимула от синего до желтого, во втором — использовали буквенно-цифровой метод обозначения цветового тона. Характеристики цвета в системе Манселла (цветовой тон, светлота, насыщенность) тесно связаны с характеристиками цветового восприятия, что позволяет широко применять ее для определения цвета различных объектов. Шкала цветности гонад и цветовые измерения приведены в таблице. Как видно из данных таблицы, по мере созревания яичников происходит уменьшение показателя светлоты L^* , причем наиболее резкий переход отмечается между бежевым и светло-коричневым цветами. Для коричневого, темно-фиолетового и бурого цветов различия между показателями цветности a^* и b^* не велики. Возникновение фиолетового оттенка связано с уменьшением цветового стимула b^* (т.е. увеличением доли синего цвета). Таким образом, полученные с помощью визуального (субъективного) и инструментального (объективного) методов оценки цветовые характеристики яичника на разных стадиях зрелости хорошо согласуются друг с другом.

Цветовые характеристики яичников *E. japonica* на разных стадиях зрелости

Стадия зрелости гонад	Название цвета	Цветовые характеристики				Концентрация каротиноидов, мг/100 г сырой ткани ¹
		по Манселлу	CIE $L^*a^*b^*$ (1976)			
			L^*	a^*	b^*	
1-я	Светло-желтый (кремовый)	5Y/9/2	57,8	7,6	35,7	1,4±0,3
2-я	Желтый (бежевый)	2.5Y/9/4	51,0	8,7	27,3	2,6±1,5
3-я	Светло-коричневый	7.5YR/8/6	37,2	9,9	24,3	7,8±1,6
3-я	Светло-фиолетовый	5P/7/6	29,7	8,6	9,8	9,7±4,3
4-я	Коричневый (шоколадный)	5YR/5/6	29,9	7,7	19,3	16,8±0,9
4-я	Темно-фиолетовый	2.5RP/2.5/4	24,7	4,5	6,7	18,8±1,5
5-я	Темно-коричневый (бурый)	2.5YR/2.5/2	24,2	5,8	12,6	22,0±2,5

¹ Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

Известно, что за цветовые изменения гонад ракообразных отвечают каротиноиды — группа тетратерпеновых пигментов. Мы провели спектрофотометрический анализ их содержания на различных стадиях зрелости яичника. Обычно при таких измерениях используют удельный коэффициент поглощения 250 мл/см·мг (типичный для каротинов и ксантофиллов), измерение оптической плотности ведут на 450 нм (Карнаухов, 1988). Для объектов, содержащих большую долю кетокаротиноидов, например, лососевых рыб и ракообразных, часто применяют коэффициент 210 (характерный для кетокаротиноидов) и измеряют оптическую плотность на 470 нм (Screde, Storebakken, 1986).

Учитывая, что все эти группы каротиноидов представлены в яичниках крабов в сопоставимых количествах (Matsuno, Maoka, 1988), мы провели сравнение концентраций, рассчитанных с использованием обоих коэффициентов. Как видно из графика (рис. 1), при малых концентрациях показатели оптической плотности почти не различаются, а при увеличении концентрации наблюдается увеличение расхождения получаемых данных. Вероятно, расчеты с использованием значений оптической плотности на 450 нм дает несколько заниженные результаты, а на 470 — завышенные. По хроматографическим данным содержание только фракции каротинов составило 30–50 % общего количества пигментов, поэтому в дальнейшем мы использовали значения концентраций, полученных с использованием измерений оптической плотности при 450 нм.

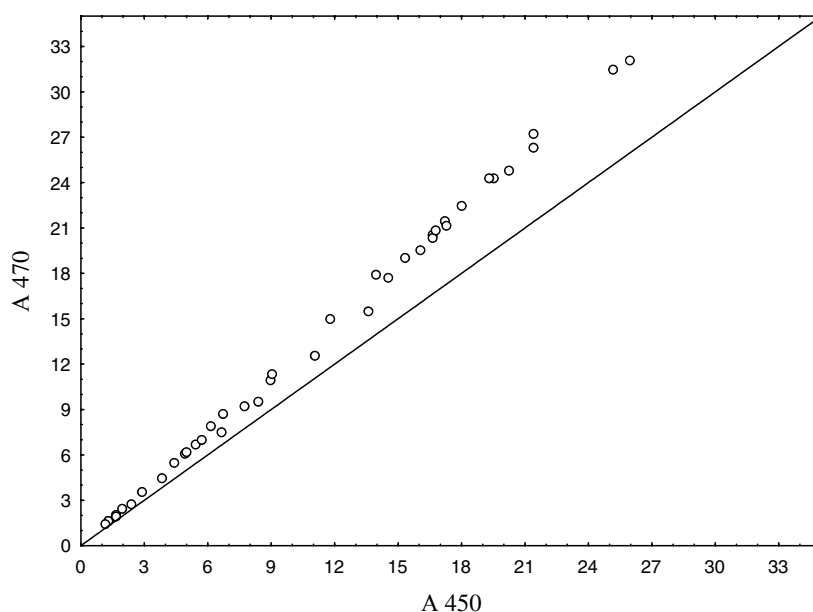


Рис. 1. Сопоставление концентраций каротиноидов, определенных спектрофотометрически. По оси абсцисс приведена концентрация (мг/100 г ткани), полученная при измерении оптической плотности на 450 нм и использовании коэффициента 250 мл/см·мг, по оси ординат — 470 нм и 210 мл/см·мг. Показана прямая $y = x$

На начальных этапах развития яичники в основном заполнены оогониями и ооцитами на стадиях хромосомных преобразований и превителлогенеза. В это время поступления запасных веществ в половые клетки еще не наблюдается, и гонады окрашены в бледные цвета (от кремового до бежевого). Среднее значение концентрации каротиноидов невелико и составляет 1,4 и 2,6 мг/100 г сырой ткани, соответственно. На стадии первичного вителлогенеза в ооцитах начинаются процессы накопления запасных веществ (и пигментов в том числе), при этом цвет гонад становится более насыщенным, но не интенсивным (светло-коричневый и светло-фиолетовый). Происходит значительное увеличение содержания каротиноидов в гонадах до 7,8 и 9,7 мг/100 г сырой ткани, соответственно. В дальнейшем процессы вителлогенеза начинают преобладать над процессами превителлогенеза, и цвет гонад постепенно меняется на коричневый (шоколадный) и темно-фиолетовый. При этом концентрация каротиноидов также продолжает увеличиваться (соответственно 16,8 и 18,8 мг/100 г). На преднерестовой стадии, когда гонада практически полностью заполнена закончившими трофоплазматический рост ооцитами, насыщенность и интенсивность окраски яичников становится максимальной, и они приобретают бурый цвет. На этой стадии концентрация каротиноидов увеличивается незначительно (до 22,0 мг/100 г). Учитывая спектры поглощения каротиноидов, фиолетовый и коричневый цвета вероятно обусловлены присутствием соответствующих каротинопротеинов (Goodwin, 1984).

Таким образом, в процессе созревания гонад самок происходит закономерное изменение цвета яичника, сопровождаемое более чем десятикратным увеличением содержания каротиноидов.

Качественный состав каротиноидов зрелых яичников довольно сложен. Первичное разделение экстракта методом ВЭЖХ на силикагеле дает 16 фракций, ряд из которых также представляет собой смесь нескольких каротиноидов (рис. 2).

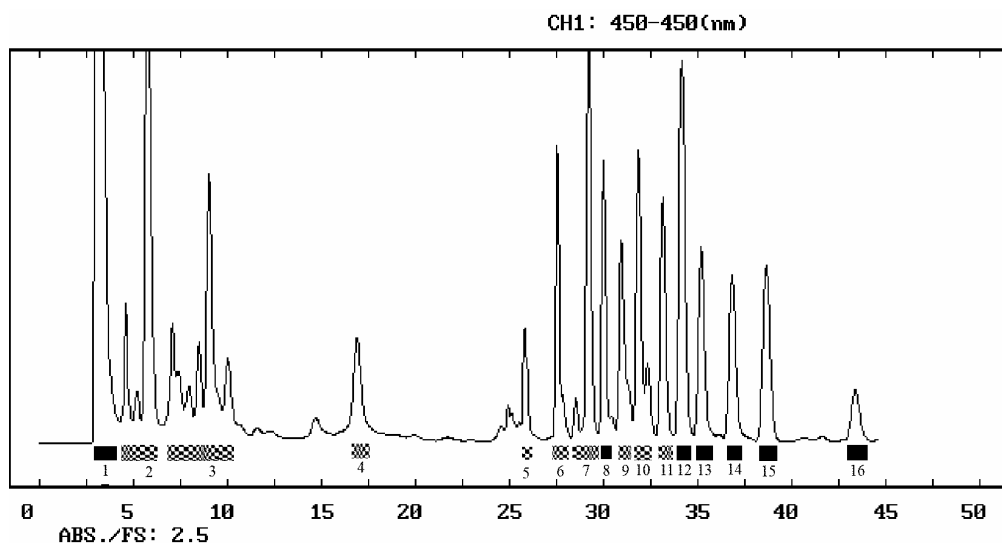




Рис. 2. Хроматограмма каротиноидов яичников *E. japonica*.  — кетокаротиноиды,  — каротиноиды с тонкой структурой спектра (по данным спектров поглощения)

На основании спектральных данных и хроматографического поведения пик 1 представляет собой фракцию каротинов (возможно, β,ϵ - и β,β -изомеры). Вещество пика 7 было идентифицировано как астаксантин, так как имеет те же спектральные данные и время удерживания, что и стандарт астаксантина. Для остальных компонентов на основании вида спектра поглощения (Бриттон, 1986) можно установить, является ли это вещество кетокаротиноидом (колоколообразный спектр) или нет (имеется 2 или 3 максимума) (рис. 2).

Почти десятикратное увеличение общего количества каротиноидов в процессе роста яичников сопровождается закономерным, хотя и небольшим, изменением соотношения основных пигментов (рис. 3).

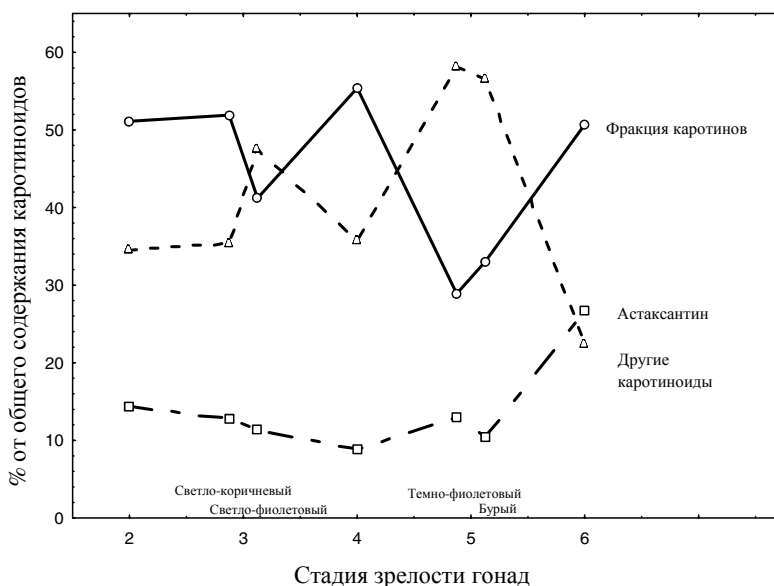


Рис. 3. Изменение соотношения фракций каротиноидов в течение репродуктивного цикла. За 100 % принята концентрация, определенная спектрофотометрически

На 2–5-й стадиях зрелости нами отмечено уменьшение относительного количества фракций каротинов с 51 до 33 % общего содержания каротиноидов и увеличения количества остальных компонентов, часть из которых, как можно предположить, является интермедиа-

тами конверсии β, β -каротина в астаксантин. Исключение составляет стадия 4. Принимая во внимание резкое увеличение концентрации пигментов (с 9,7 до 16,8 мг/100 г — см. таблицу), можно предположить, что скорость накопления каротинов на этой стадии превосходит скорость их утилизации. В то же время доля астаксантина на этих стадиях относительно постоянна. Яичники на 6-й (посленерестовой) стадии характеризуется невысоким суммарным содержанием каротиноидов ($2,1 \pm 1,1$ мг/ 100 г) и самым высоким процентным содержанием астаксантина (26,8 %).

Обнаруженные изменения содержания каротиноидов в яичниках *E. japonica* свидетельствуют об активности и важности пигментного метаболизма в репродуктивном цикле. В то же время для понимания механизмов изменения цвета необходимо исследование каротинопротеинов, отвечающих за фиолетовую и коричневую окраску яичников.

ЛИТЕРАТУРА

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. — М.: Мир, 1986. — 442 с.
- Калинина М.В., Винникова Н.А., Семенькова Е.Г. Созревание и цветковые характеристики яичников японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonicus* (Crustacea: Decapoda, Grapsida) // Онтогенез. — 2008. — Т. 39, № 1. — С. 1–8.
- Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. — М.: Наука, 1988. — 240 с.
- Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / под ред. С.Я. Цалолыхина. — СПб.: ЗИН РАН, 1995. — Т. 2. — 629 с.
- Ромейс П.Н. Микроскопическая техника. — М.: Иностран. лит-ра, 1955. — 718 с.
- Goodwin T.W. The biochemistry of the carotenoids. Vol. 2: Animals. — L.: Chapman & Hall, 1984. — 224 p.
- Kobayashi S. Process of maturity and reproduction of female Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (de Haan) // Crustacean Res. — 2003. — Vol. 32. — P. 32–44.
- Kobayashi S., Matsuura S. Morphological changes of the exoskeleton of the female Japanese mitten crab, according to growth and maturity // Researches on Crustacea. — 1992. — Vol. 21. — P. 159–168.
- Matsuno T., Maoka T. The carotenoids of crab *Paralithodes brevipes* (Hanasakigani in Japanese) // Nippon Suisan Gakkaishi. — 1988. — Vol. 54. — P. 1437–1442.
- Munsell Book of Color. Mate finish collection. — Baltimore: Munsell Color, 1976.
- Screde G., Storebakken T. Characteristic of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic Salmon // J. Food Sci. — 1986. — Vol. 51. — P. 804–808.