

УДК 595.384.2(265.54)

ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВОГО ЦИКЛА И ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ЯИЧНИКАХ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗРЕЛОСТИ ЯПОНСКОГО МОХНАТОРУКОГО КРАБА, ОБИТАЮЩЕГО В РЕКАХ ПРИМОРЬЯ

© 2009 г. М. В. Калинина, П. А. Задорожный*, Н. А. Винникова**

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр
690950 Владивосток, пер. Шевченко, д. 4

*Институт химии ДВО РАН

690022 Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, д. 159

**Дальневосточный государственный университет

690950 Владивосток, ул. Суханова, д. 8

E-mail: kalininamv@tinro.ru; zadorozhny@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.08 г.

Окончательный вариант получен 05.12.08 г.

Установлено, что в водоемах Приморья, на севере ареала, половой цикл японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* (de Naan, 1835) имеет свои особенности, к которым относятся изменение сезонной динамики стадий зрелости гонад, смещение сроков нереста на более поздние и сокращение сезона размножения. По мере роста гонад у самок закономерно меняется цвет яичника, что сопровождается увеличением общего количества каротиноидов с 1.4 до 22.0 мг/100 г ткани и изменением соотношения основных пигментов. В процессе созревания яичников в них заметно уменьшается относительное содержание фракции каротинов и в небольшой степени доля астаксантина. Обнаруженные изменения содержания каротиноидов в яичниках свидетельствуют об активности и важности пигментного метаболизма в репродуктивном цикле *E. japonica*.

Ключевые слова: яичник, стадия зрелости, половой цикл, цветовые характеристики, каротиноиды.

Японский мохнаторукий краб *Eriocheir japonica* (de Naan, 1835) – субтропический катадромный вид – широко распространен в северо-восточной части тихоокеанского побережья, включая Приморье (Определитель ..., 1995; Барабанщиков, 2002). Исследования, посвященные биологии размножения этого вида, в большинстве своем касаются животных, обитающих в центральной части ареала, у Японских островов (Kobayashi, Matsuura, 1991, 1995; Kobayashi, 1999, 2003 и др.). Условия обитания *E. japonica* в Приморье на севере ареала существенно отличаются от таковых в водоемах Японии, поэтому жизненный цикл мохнаторукого краба в этой среде имеет ряд особенностей. Так, в водоемах Приморья в отличие от более южных районов ареала мохнаторукий краб зимует в реках и озерах в половозрелом состоянии, в результате чего нерестовые миграции и сезон размножения у него сдвинуты на теплый период года (Семенькова, 2005; Семенькова, Калинина, 2006). Однако половой цикл *E. japonica* в водах Приморского края до сих пор остается мало изученным (Калинина, Винникова, 2007). В последнее время японский мохнаторукий краб вошел в

число перспективных промысловых объектов, поэтому для сохранения биологического потенциала этого вида необходимо знать особенности биологии его размножения в Приморье.

По мере роста яичников происходит закономерное изменение их цвета, что связано с характерной чертой ракообразных накапливать в гонадах природные пигменты каротиноиды – в свободной форме и в виде хромопротеинов (Goodwin, 1984). Образование каротино-белкового комплекса обычно вызывает значительный батохромный сдвиг в спектре поглощения, часто приводя к пурпурному, голубому или зеленому цветам, тогда как свободные каротиноиды имеют желтую или оранжевую окраску. В яичниках ракообразных часть каротиноидов ассоциирована с высокомолекулярным белком вителлином, что является причиной яркого цвета гонад в период вителлогенеза (Wallace et al., 1967; Meusy, Payen, 1988).

В настоящее время функции каротиноидов являются предметом интенсивных исследований и дискуссий. Одной из наиболее очевидных функций каротиноидов у животных является придание

им защитной и брачной окраски (Бриттон, 1986). Многие каротиноиды принимают участие в важных метаболических и физиологических процессах. Некоторые из них являются предшественниками витамина А; имеются сведения о том, что каротиноиды осуществляют защиту клеток от разрушительного действия синглетного кислорода, ультрафиолетового и ионизирующего излучений (Карнаухов, 1988), а также участвуют в регуляции экспрессии генов (Nix et al., 2004). Каротиноиды могут стабилизировать белки путем формирования каротинопротеинов, которые более устойчивы к факторам окружающей среды, например к тепловым воздействиям, и защищают яйца ракообразных от потери жизнеспособности в широком диапазоне температуры и влажности (Goodwin, 1984; Vershinin, 1999). Несомненно связь этих пигментов с процессами репродукции (Goodwin, 1984). Известно, что концентрация каротиноидов в гонадах самок меняется на разных стадиях зрелости. Например, у лангуста *Cherax quadricarinatus* общее содержание каротиноидов в зрелых яичниках в пять раз больше, чем в яичниках на ранних стадиях зрелости (Sagi et al., 1995), а у *Plesiopenaeus edwardsii* оно увеличивается от 20 до 518 мг/г (Goodwin, 1984). По данным Матсуно и Маока (Matsuno, Maoka, 1988), в гонадах краба *Paralithodes brevipes* каротиноиды присутствуют только в неэтерифицированной форме, причем более 60% от общего количества каротиноидов приходится на β , β -каротин.

Ранее с помощью визуального метода мы построили таблицу цветов яичника *E. japonica* по стадиям зрелости и дали подробное описание клеточного состава гонад у ювенильных и взрослых самок (Калинина и др., 2008). Цель настоящей работы – изучение особенностей полового цикла японского мохнаторукого краба в водоемах Приморья и оценка изменения содержания каротиноидов на разных стадиях зрелости яичника.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Половозрелых самок японского мохнаторукого краба собирали в реке Раздольная Приморского края в 2005–2007 гг. ежемесячно, за исключением января, что связано с трудностями отлова животных в этот период времени. Пол животных определяли по форме живота (Kobayashi, Matsuura, 1992).

У каждого животного измеряли ширину карапакса штангенциркулем с точностью до 1 мм, определяли массу тела с клешнями (ВТ) и без клешней (ВТбК) на электронных весах с точностью до 1 г. Гонадо-соматический индекс (ГСИ) рассчитывали по формуле: $\text{ГСИ} = \text{ВГ}/\text{ВТбК} \times 100\%$.

Кусочки гонад фиксировали в 96%-ном этиловом спирте и смеси формалин-спирт-уксусная

кислота (ФСУ) в соотношении 3 : 1 : 0,3, фиксированный материал заливали в парафин по стандартной методике (Ромейс, 1955). Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином (“Лаботех”, Россия). Препараты просматривали и анализировали под микроскопом LABOVAL 4. Стадии зрелости яичников определяли по классификации, предложенной Кобаяси (Kobayashi, 2003), включающей у *E. japonica* шесть стадий: 1 – пролиферация оогониев и хромосомных преобразований ооцитов, 2 – малый рост ооцитов, 3 – начало трофоплазматического роста, 4 – активный трофоплазматический рост, 5 – преднерестовая, 6 – посленерестовая.

Цвет гонад определяли визуально, используя атлас Манселла (Munsell book ..., 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 C400 (“Konica Minolta”, Япония), источник света С. Цвет измеряли в системе CIE $L^*a^*b^*$ (1976), где L^* – светлота, a^* – краснота, учитывающая изменение цветового стимула от зеленого до красного, b^* – желтизна, учитывающая изменение цветового стимула от синего до желтого.

Для анализа каротиноидов использовали свежие образцы гонад самок краба на разных стадиях зрелости. Навеску яичников (около 1 г) экстрагировали десятикратным объемом ацетона с последующим переводом каротиноидов в гексан (Карнаухов, 1988). Полученный экстракт сушили безводным сульфатом натрия и подвергали спектрофотометрическому или хроматографическому анализу.

Оптическую плотность экстрактов определяли с помощью спектрофотометра UV-3100 (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 450 и 470 нм с использованием удельного коэффициента поглощения 250 или 210 $\text{мл}/\text{см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ соответственно. За суммарное содержание каротиноидов принимали значение, определенное спектрофотометрически с использованием коэффициента 250 $\text{мл}/\text{см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на нормальнофазной колонке Zorbax Sil (5 мкм, 250 × 4.6 мм, “Du Pont Co. Ltd”, США), используя хроматограф Shimadzu (насос LC-6A, детектор SPD-M6A), скорость потока элюента 1 $\text{мл} \times \text{мин}^{-1}$, детектирование вели при длине волны 450 нм. Для разделения использовали ступенчатый градиент растворителей гексан-ацетон в объемных соотношениях 92 : 8 и 8 : 2. Смену элюента проводили на 11-й мин. Содержание фракции каротинов и астаксантина определяли хроматографически. Для калибровки детектора использовали метод внешнего стандарта. В

Таблица 1. Сезонная динамика средних значений гонадо-соматического индекса (ГСИ) и стадий зрелости яичника у японского мохнаторукого краба

Месяц (дата)	Число экз.	Ширина карапакса, мм	Доля самок на разных стадиях зрелости яичника, %					ГСИ, %
			2	3	4	5	6	
Август	26	62.3 (45–71)	58	34	8	–	–	1.1 (0.4–2.8)
Сентябрь	32	64.0 (54–72)	10	–	25	65	–	3.7 (0.7–6.9)
Октябрь**	58	55.3 (49–69)	–	–	20	80	–	5.8 (1.4–6.0)
Ноябрь**	81	54.6 (49–69)	–	–	–	100	–	7.8 (5.2–11.5)
Декабрь	30	68 (60–76)	–	–	–	100	–	8.3 (5.0–11.5)
Февраль	7	67 (61–72)	–	–	–	100	–	8.7 (6.5–11.5)
Март	23	66.0 (51–76)	–	–	–	100	–	9.8 (4.4–19.8)
Апрель	12	61.8 (58–68)	–	–	–	100	–	9.17 (5.9–14.0)
Май (14.05.2006)	18	62.8 (58–68)	–	–	–	100	–	8.8 (5.1–14.3)
Май (25–30.05.2006)	7 22*	55.6 (47–63) 62.8* (53–72)	– 18	– 41	– 18	100 5	– 18	8.5 (6.1–10.4) 2.2* (1.2–4.2)

Примечания. * Яйценосные самки, ** по данным: Семенькова, Калинина, 2006. Значения приведены в виде среднего, в скобках указаны пределы изменчивости.

качестве стандартов использовали фракцию каротинов, выделенную из моркови, и астаксантин (“Sigma-Aldrich Corp.”, США). Количество остальных каротиноидов оценивали, вычитая содержание каротинов и астаксантина из суммарного содержания каротиноидов, определенного спектрофотометрическим методом.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сезонная динамика состояния гонад. В результате наших предыдущих исследований было установлено, что в реках южного Приморья у *E. japonica* массовая линька половозрелости, которая для этого вида является и последней, проходит во второй половине августа. Минимальный размер зрелых самок и самцов составляет 40 мм (Семенькова, Калинина, 2006). В течение осенних месяцев в гонадах самок наблюдаются процессы вителлогенеза, и в конце ноября животные уходят на зимовку со зрелыми гонадами (Калинина, Винникова, 2007). Результаты настоящего исследования показали, что в конце августа половые железы не яйценосных самок в основном находились на 2-й и 3-й стадиях зрелости (табл. 1). Во второй половине сентября больше половины особей имели гонады на 5-й стадии (в начальной ее фазе), а в конце октября их доля составила 80%. Во второй половине ноября яичники у всех исследованных самок находились на 5-й стадии и в основном были заполнены ооцитами дефинитив-

ных размеров, закончившими трофоплазматический рост, т.е. готовыми к созреванию и оплодотворению. Однако в это время нереста не наблюдалось, и в течение всех зимних месяцев яичники самок находились на 5-й стадии. Следует отметить, что резорбции крупных ооцитов при этом не происходило. В то же время были отмечены морфопатологические изменения превителогенных ооцитов, присутствующих в гонаде в небольшом количестве: вакуолизация цитоплазмы и разрушение клеточной оболочки, в результате чего на их месте образовывались множественные пустоты. В весенние месяцы (апрель–май) в яичниках наблюдалась активизация гаметогенетических процессов: увеличение числа оогониев и ооцитов цитоплазматического роста, формирующих небольшие зоны среди клеток дефинитивных размеров. Параллельно в яичниках продолжали идти процессы вителлогенеза, характеризующиеся увеличением желточной массы в ооцитах, и подготовка последних к овуляции. Во второй половине мая были отмечены первые яйценосные самки с яичниками на 6-й (посленерестовой) стадии, т.е. приступившие к размножению. Начиная со второй половины мая и в течение всех летних месяцев животные находились в нерестовом состоянии и характеризовались высокой вариабельностью по состоянию гонад (от 2-й до 6-й стадии зрелости) в зависимости от стадии развития эмбриона. Половые железы у только что отнерестившихся самок находились на 6-й стадии зрелости, у самок с эмбрионами на начальных этапах развития на 2-й и 3-й стадиях, а более поздним этапам эмбриогенеза соответствовали 4-я и 5-я стадии зрелости гонад.

Яичники на посленерестовой стадии были заполнены преимущественно ооцитами малого роста и невыметанными дефинитивными ооцитами. Последние располагались в основном по периферии и находились в той или иной степени резорбции. Между ооцитами малого роста отдельными небольшими зонами располагались оогонии и ооциты на стадии хромосомных преобразований. Отличительной особенностью посленерестовой стадии является присутствие в яичнике в большом количестве фолликулярных оболочек, оставшихся после выметанных ооцитов и занимающих значительные площади. Фолликулярные клетки также окружают невыметанные ооциты, активно участвуя в их резорбции.

Индивидуальные значения ГСИ в течение года изменялись от 0,4 до 19,8%, а средние значения этого показателя от 1,1 (август) до 9,8% (март) (табл. 1). В таблице 1 не приводятся данные за июнь и июль из-за высокой вариабельности индивидуальных показателей ГСИ у яйценосных самок. С августа по декабрь по мере роста яичников их масса существенно увеличивалась и достигала наибольших значений у особей со зрелыми гонадами. В зимние месяцы средние значения ГСИ оставались примерно на одном уровне (8,3% в декабре и 8,7% – в феврале), а индивидуальные не опускались ниже 5,0%. В марте отмечены самые высокие индивидуальные и средние показатели ГСИ (19,8 и 9,8% соответственно). Следует отметить, что в течение зимних и весенних месяцев, т.е. в период времени, когда гонады самок находились на 5-й стадии зрелости, средние значения ГСИ достоверно не различались (рис. 1). В третьей декаде мая гонады животных, приступивших к размножению, характеризовались низкими значениями ГСИ: у яйценосных самок индивидуальные значения варьировали от 1,23 до 4,15%, в среднем составив 2,21%.

Изменение цветовых характеристик и содержание каротиноидов на разных стадиях зрелости гонад. С помощью визуального метода и атласа цветов Манселла мы составили таблицу цветов яичника *E. japonica* на разных стадиях зрелости, включающую восемь цветов (Калинина и др., 2008). 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). Гонады 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 ее 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

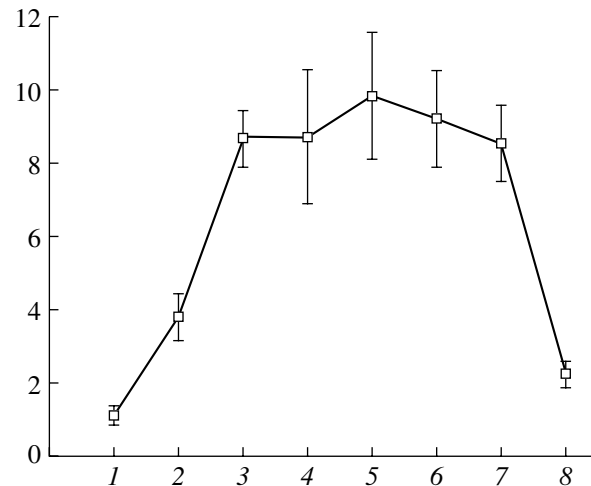


Рис. 1. Гонадо-соматический индекс (ГСИ) японского мохнаторукого краба (по оси ординат, %) в разные месяцы года (по оси абсцисс): 1 – август, 2 – сентябрь, 3 – декабрь, 4 – февраль, 5 – март, 6 – апрель, 7, 8 – май (неяйценосные и яйценосные самки соответственно). (□) – среднее арифметическое, (┌) – доверительный интервал, уровень значимости 0,95.

гонады преимущественно заполнены ооцитами малого роста и невыметанными зрелыми ооцитами, которые визуально выглядят как мелкие черные вкрапления.

Учитывая субъективность словесных описаний цвета, в настоящей работе была проведена инструментальная оценка цвета гонад с помощью отражательного колориметра, что позволило получить точные и объективные результаты измерения цвета. Шкала цветности гонад и цветовые измерения приведены в табл. 2, как видно из ее данных, 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^* невелики. 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.

Поскольку за цветовые изменения гонад ракообразных отвечают каротиноиды – группа тетрапиреновых пигментов, – мы провели спектрофотометрическое определение их содержания на различных стадиях зрелости яичника. Обычно при таких измерениях используют удельный коэффициент поглощения $250 \text{ мл/см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ (типичный для каротинов и гидроксикаротиноидов), а измерение оптической плотности – при 450 нм

Таблица 2. Цветовые характеристики яичников и суммарное содержание каротиноидов в них у японского мхнаторукого краба на разных стадиях зрелости

Стадия зрелости яичника	Название цвета	Цветовая характеристика яичника				Суммарное содержание каротиноидов, мг/100 г сырой ткани**
		по Манселлу	СИЕ $L^*a^*b^*$ (1976)			
			L^*	a^*	b^*	
1	Светло-желтый (кремовый)	5Y9/2	57.8	7.6	35.7	1.4 ± 0.3
2	Желтый (бежевый)	2.5Y9/4	51.0	8.7	27.3	2.6 ± 1.5
3	Светло-коричневый	7.5YR/8/6	37.2	9.9	24.3	7.8 ± 1.6
3	Светло-фиолетовый	5P7/6	29.7	8.6	9.8	9.7 ± 4.3
4	Коричневый (шоколадный)	5YR/5/6	29.9	7.7	19.3	16.8 ± 0.9
4	Темно-фиолетовый	2.5RP/2.5/4	24.7	4.5	6.7	18.8 ± 1.5
5	Темно-коричневый (бурый)	2.5YR/2.5/2	24.2	5.8	12.6	22.0 ± 2.5

Примечание: ** значения приведены в виде среднего и его стандартного отклонения.

(Карнаухов, 1988). Для объектов, содержащих значительную долю кетокаротиноидов, например для лососевых рыб и ракообразных, часто применяют коэффициент $210 \text{ мл/см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ (характерный для кетокаротиноидов) и измеряют оптическую плотность при длине волны 470 нм (Screde, Storebakken, 1986). Учитывая, что все эти группы каротиноидов представлены в яичниках крабов в сопоставимых количествах (Matsuno, Maoka, 1988), мы провели сравнение их содержания, рассчитанного с использованием обоих коэффициентов. Как видно из графика (рис. 2), при малом содержании каротиноидов результаты обоих способов расчета почти не различаются между собой, а при повышении его наблюдается

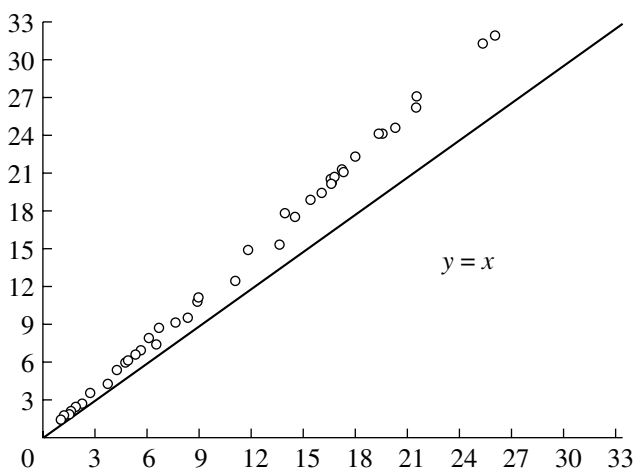


Рис. 2. Суммарное содержание каротиноидов в яичниках японского мхнаторукого краба (мг/100 г сырой ткани), определенное спектрофотометрически при длине волны 450 нм и использовании коэффициента $250 \text{ мл/см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ (по оси абсцисс) и при длине волны 470 нм и использовании коэффициента $210 \text{ мл/см}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ (по оси ординат).

расхождение данных. Вероятно, расчеты с использованием значений оптической плотности при длине волны 450 нм дают несколько заниженные результаты, а при длине волны 470 нм – завышенные. По данным, полученным хроматографически, содержание только фракции каротиноидов составляет 30–50% от общего количества пигментов, поэтому мы учитывали величины содержания, полученные с использованием значений оптической плотности при длине волны 450 нм.

На начальных этапах развития яичников (1–2-я стадии зрелости) поступления запасных веществ в половые клетки не наблюдается, гонады окрашены в бледные цвета (от кремового до бежевого), и среднее значение содержания каротиноидов невелико (1.4 и 2.6 мг/100 г сырой ткани соответственно). С началом вителлогенеза (3-я стадия) в яичниках начинаются процессы накопления запасных веществ, цвет гонад становится более насыщенным, но не интенсивным (светло-коричневый и светло-фиолетовый), и происходит значительное увеличение содержания каротиноидов в гонадах (до 7.8 и 9.7 мг/100 г сырой ткани соответственно). На стадии активного трофоплазматического роста (4-я стадия) цвет гонад постепенно меняется на коричневый (шоколадный) и темно-фиолетовый, при этом содержание каротиноидов продолжает увеличиваться (16.8 и 18.8 мг/100 г соответственно). На преднерестовой стадии (5-я стадия) насыщенность и интенсивность окраски яичников становится максимальной, и они приобретают бурый цвет. На этой стадии содержание каротиноидов увеличивается незначительно (до 22.0 мг/100 г). Таким образом, в процессе созревания гонад самок происходит закономерное изменение цвета яичника, сопровождаемое более чем десятикратным увеличением содержания каротиноидов.

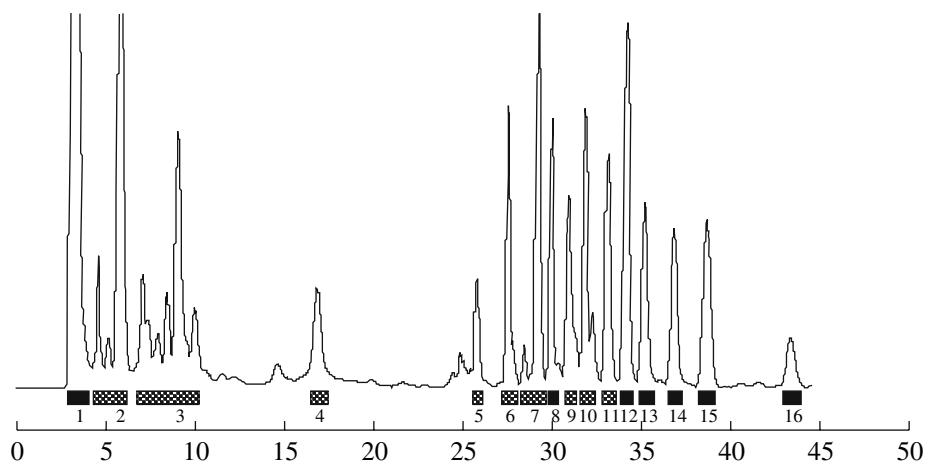


Рис. 3. Хроматограмма каротиноидов яичников *E. japonica* на 5-й стадии зрелости.

(▣) – кетокаротиноиды, (■) – каротиноиды с тонкой структурой спектра (по данным спектров поглощения); 1 – фракция каротинов, 7 – астаксантин. По оси абсцисс время удерживания, мин; по оси ординат – поглощение при 450 нм.

Качественный состав каротиноидов зрелых яичников довольно сложен. Первичное разделение экстракта методом ВЭЖХ на силикагеле дает 16 фракций, некоторые из которых представляют собой смесь нескольких каротиноидов (рис. 3). На основании данных спектрального и хроматографического анализов пик 1 представляет собой фракцию каротинов. На основании спектра поглощения можно предположить преобладание β,β -изомера (возможно, с примесью β,ϵ -каротина). Вещество пика 7 было идентифицировано как астаксантин, так как имеет те же спектральные данные и время удерживания, что и стандарт астаксантина. На основании вида спектра поглощения можно заключить, соответствует ли он кетокаротиноидам или нет (рис. 3). В первом случае это характерный колоколообразный спектр (Бриттон, 1986), а во втором имеются два или три максимума, соответствующие как каротинам, так и разнообразным гидроксикаротиноидам.

Почти десятикратное увеличение общего количества каротиноидов в процессе роста яичников сопровождается изменением соотношения основных пигментов (рис. 4). Гонаду на 1-й стадии зрелости мы не анализировали из-за невозможности отобрать пробу в необходимом количестве. На 2–5-й стадиях зрелости мы отметили уменьшение относительного количества фракций каротинов с 51 до 33% от общего содержания каротиноидов, причем на 5-й стадии зрелости – резкое снижение. При этом увеличивается количество остальных пигментов, часть из которых, как можно предположить, является интермедиатами конверсии β,β -каротина в астаксантин. Исключение составляет 4-я стадия. Принимая во внимание резкое увеличение содержания пигментов (с 9.7

до 16.8 мг/100 г; табл. 2), 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 стадии характеризуются невысоким суммарным содержанием каротиноидов (2.1 ± 1.1 мг/100 г) и самым высоким процентным содержанием астаксантина (26.8%).

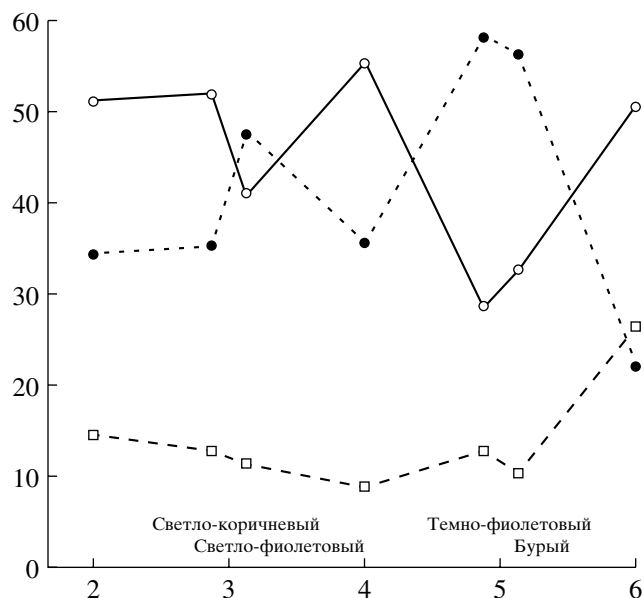


Рис. 4. Содержание фракций каротиноидов (по оси ординат, % от общего содержания) на разных стадиях зрелости яичника японского мохнаторукого краба. (○) – фракция каротинов, (□) – астаксантин, (●) – другие каротиноиды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мохнаторукий краб является эврибионтным видом, обитающим в динамичной экосистеме – в сети эстуариев и дельтах рек, поэтому он хорошо приспособлен к постоянной перемене солености и температуры. По данным Семеньковой (2007), в Приморье в местах обитания краба соленость изменяется от 0 до 30‰, а температура от 2–4°C (зимой) до 28–32°C (летом). В Японии же, по данным Кобаяси и Матсуура (Kobayasi, Matsuura, 1991), температура воды зимой обычно не опускается ниже 8.5–9.5°C. Однако, несмотря на высокую адаптивную пластичность, на определенных этапах жизненного цикла, например на стадии планктотрофной личинки, выживаемость *E. japonica* лимитируется, в частности, температурой, что сказывается и на сроках размножения (Барабанщиков, 2002). Известно, что нерест у донных беспозвоночных с планктотрофной личиночной стратегией размножения происходит во время, благоприятное для выживания личинок (Касьянов, 1989). В умеренных водах это весенне-летний период (Слизкин, Сафронов, 2000). О влиянии климатических условий на сроки размножения и время созревания гонад у беспозвоночных одного вида указывают и многие другие авторы (Кауфман, 1977; Милейковский, 1981).

В водоемах Японии у самок *E. japonica* после линьки половозрелости рост гонад до полного созревания происходит в течение 2–3 мес, после чего животные сразу приступают к размножению (Kobayasi, 2003). Температура, при которой мохнаторукий краб может размножаться, колеблется от 6.5 до 27.8°C, что позволяет ему в условиях относительно высоких зимних температур на юге Японии (префектура Фукуока) размножаться до 10 мес в году (Kobayasi, Matsuura, 1995). Это становится возможным благодаря наличию двух групп животных с разными сроками созревания гонад, первая из которых нерестится с сентября по декабрь, а вторая с декабря по июнь (Kobayasi, 1999). В то же время в северных районах Японии период размножения краба короче – с декабря по июнь. У самок *E. japonica*, обитающих в реках южного Приморья, вителлогенез занимает около 3 мес, однако нереста краба в ноябре–декабре не происходит, и животные уходят на зимовку со зрелыми гонадами. В зимние месяцы на фоне низких температур процессы вителлогенеза приостанавливаются и наблюдается деструкция превителлогенных ооцитов. С началом весеннего прогрева вод гаметогенетические процессы вновь активизируются и в первую очередь это касается превителлогенных ооцитов и оогоний. Перезимовавшие взрослые особи участвуют в размножении в ве-

сенне-летний период, когда температура воды поднимается до 7–10°C. Сезон размножения мохнаторукого краба в водах Приморья длится около 5 мес, с конца апреля до начала сентября, при этом значительная часть крабов после размножения погибает (Семенькова, 2005). В реках южного Приморья за сезон размножения самки мохнаторукого краба могут нереститься до трех раз, что указывает на порционный характер нереста. После нереста развитие эмбрионов и рост яичника протекают параллельно, а степень зрелости яичника находится в прямой зависимости от стадии развития эмбриона. В целом у яйценосных самок вителлогенез протекает таким же образом, что и у неяйценосных.

Увеличение общего количества каротиноидов в процессе созревания яичников *E. japonica* согласуется с литературными данными для других видов ракообразных (Goodwin, 1984; Sagi et al., 1995). Однако мы не обнаружили увеличения доли астаксантина, как это происходит в случае с *Cherax quadricarinatus* (Sagi et al., 1995). На всех стадиях зрелости яичника доля астаксантина составляла 10–15% от общего количества каротиноидов. Только после нереста, когда большая часть каротиноидов переходит из яичника в яйцеклетки и содержание пигментов в гонадах резко падает, относительное содержание астаксантина в них превысило 20%. Фракция каротинов является преобладающей и на ранних стадиях зрелости гонад составляет более 50% от общего количества пигментов. В дальнейшем доля этой фракции несколько падает за счет образования более полярных каротиноидов, вероятно, предшественников астаксантина. В то же время изменение цвета яичников указывает на изменение состояния каротиноидов. Известно, что свободные каротиноиды окрашивают ткани в желто-оранжевые и красные оттенки, в то время как фиолетовый, зеленый и коричневый цвета обусловлены наличием каротинопротеинов (Goodwin, 1984). Изменение спектра поглощения объясняется поляризацией молекулы пигмента при взаимодействии с белком, причем для батохромного сдвига необходимо наличие кетогруппы в положениях 4 и 4' (Britton et al., 1997). Цвет яичников на 3–5-й стадиях зрелости свидетельствует об образовании таких комплексов. При обработке полярными органическими растворителями эти комплексы разрушаются: после экстракции ацетоном мы наблюдали полное обесцвечивание ткани яичников на всех стадиях зрелости, что подтверждает каротиноидную природу окраски гонад. Меланины, также способные окрашивать ткани ракообразных в ко-

ричевый цвет, при такой обработке не извлекаются.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барабанищikov Е.И. Японский мохнаторукий краб (*Eriocheir japonicus* de Haan) эстуарно-прибрежных систем Приморского края // Изв. Тихоокеан. н.-и. рыбохоз. центра. 2002. Т. 131. С. 228–248.
- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 442 с.
- Калинина М.В., Винникова Н.А. Особенности репродуктивного цикла японского мохнаторукого краба в реках Приморья // Матер. 2-й науч. конф. “Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов”. Петрозаводск, 2007. С. 66–67.
- 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. 58–67.
- Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 240 с.
- Касьянов В.Л. Репродуктивная стратегия морских двустворчатых моллюсков и иглокожих. Л.: Наука, 1989. 184 с.
- Кауфман З.С. Особенности половых циклов беломорских беспозвоночных. Л.: Наука, 1977. 265 с.
- Милейковский С.А. Экология размножения морского бентоса. М.: Наука, 1981. 93 с.
- Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 2. / Под ред. Цалолыхина С.Я. СПб.: ЗИН РАН, 1995. 629 с.
- Ромейс П.Н. Микроскопическая техника. М.: Иностран. лит-ра, 1955. 718 с.
- Семенькова Е.Г. Некоторые вопросы биологии японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonicus*, связанные с его размножением // Изв. Тихоокеан. н.-и. рыбохоз. центра. 2005. Т. 143. С. 52–62.
- Семенькова Е.Г. Биология и перспективы промысла японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* в водоемах Приморья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ РАН, 2007. 23 с.
- Семенькова Е.Г., Калинина М.В. Личинный процесс и половое созревание японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonicus* в водоемах Приморья // Вопр. рыболовства. 2006. Т. 7. № 2 (26). С. 238–250.
- Слизкин А.Г., Сафронов С.Г. Промысловые крабы прикамчатских вод. Петропавловск-Камчатский: Северная Пасифика, 2000. 180 с.
- Britton G., Weesie R.J., Askin D. et al. Carotenoid blues: structural studies on carotenoproteins // Pure Appl. Chem. 1997. V. 69. P. 2075–2084.
- Goodwin T.W. The biochemistry of the carotenoids. V. 2. Animals. L.: Chapman and Hall, 1984. 215 p.
- Hix L.M., Lockwood S.F., Bertram J.S. Bioactive carotenoids: potent antioxidants and regulators of gene expression // Redox Report. 2004. V. 9. P. 181–191.
- Kobayashi S. Reproductive ecology of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* (de Haan): a review // Jpn. J. Benthol. 1999. V. 54. P. 24–35.
- Kobayashi S. Process of maturity and reproduction of female Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (de Haan) // Crust. Res. 2003. V. 32. P. 3244.
- Kobayashi S., Matsuura S. Longitudinal distribution of the Japanese mitten crab in the Kaminokawa River, Kagoshima // Nippon Suisan Gakkaishi. 1991. V. 57. P. 1029–1034.
- Kobayashi S., Matsuura S. Morphological changes of the exoskeleton of the female Japanese mitten crab, according to growth and maturity // Res. Crust. 1992. V. 21. P. 159–168.
- Kobayashi S., Matsuura S. Reproductive ecology of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* (de Haan) in its marine phase // Benthos Res. 1995. V. 49. P. 15–28.
- Matsuno T., Maoka T. The carotenoids of crab *Paralithodes brevipes* (Hanasakigani in Japanese) // Nippon Suisan Gakkaishi. 1988. V. 54. P. 1437–1442.
- Meusy J.-J., Payen G. Female reproduction in malacostracan Crustacea // Zool. Sci. 1988. V. 5. P. 217–265.
- Munsell book of color: glossy finish collection: removable samples in two binders. Baltimore: Munsell color, Macbeth, 1976. 75 p.
- Sagi A., Rise M., Isam K., Arad S.M. Carotenoids and their derivatives in organs of maturing female crayfish *Cherax quadricarinatus* // Comp. Biochem. Physiol. 1995. V. 112B. № 2. P. 309–313.
- Screde G., Storebakken T. Characteristic of color in raw, baked and smoked wild and pen-reared Atlantic salmon // J. Food Sci. 1986. V. 51. P. 804–808.
- Vershinin A. Biological functions of carotenoids diversity and evolution // BioFactors. 1999. V. 10. P. 99–104.
- Wallace R.A., Walker S.L., Hauschka P.V. Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high density lipoprotein from the eggs of decapods // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 1582–1590.

Sexual Cycle Properties and Changes in Carotenoid Levels in Ovary of Japanese Mitten Crab *Eriocheir japonica* from Rivers of Primorye

M. V. Kalinina^a, P. A. Zadorozhnyi^b, and N. A. Vinnikova^c

^a Pacific Fisheries Research Center, per. Shevchenko 4, Vladivostok, 690950 Russia

^b Institute of Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Science, pr-t. 100-letia Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

^c Far Eastern National University, ul. Sukhanova 8, Vladivostok, 690950 Russia
e-mail: kalininamv@tinro.ru; zadorozhny@mail.ru

Abstract—The sexual cycle of Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* (de Haan, 1835) in its northern range in water bodies of the Primorye proved to have specific properties including changed seasonal dynamics of gonad maturity stages, delayed spawning period, and reduced breeding season. The ovary color regularly changed during the gonad growth in females, which was accompanied by an increase in total carotenoid content from 1.4 to 22.2 mg/100 g tissue and by changes in the proportion of major pigments. The relative content of the carotene fraction notably decreased and that of astaxanthin slightly decreased during gonad maturation. The revealed changes in carotenoid levels in the ovary point to the activity and significance of pigment metabolism in the reproductive cycle of *E. japonica*.

Key words: ovary, maturity stage, sexual cycle, color characteristics, carotenoids.