

УДК 639.3:593.953

В.В.Евдокимов

ИЗУЧЕНИЕ РАЗМНОЖЕНИЯ МОРСКИХ ЕЖЕЙ В УСЛОВИЯХ МАРИКУЛЬТУРЫ В ТИНРО-ЦЕНТРЕ

Анализируется научно-исследовательская работа, проведенная автором за несколько лет в ТИНРО-центре, по изучению влияния основных экологических факторов (температурного, пищевого и светового) на онтогенез морских ежей. На основании полученных данных была разработана биотехнология получения молоди морского ежа *Strongylocentrotus nudus* в контролируемых условиях, которая вошла в мировые биотехнологии и была опубликована в Оксфорде. Проведенные экспериментальные исследования на морских ежах позволили установить, что в процессе светового воздействия на фоне температурной стимуляции у них происходит созревание половых гамет, увеличение плодовитости, повышается жизнестойкость эмбрионов. При этом отмечается, что свет не только определенным образом действует на репродуктивный процесс морского ежа, но и его воздействие на оо- и сперматогенез различно. Свет с длиной волны 720 нм активизирует развитие гонад. Об этом свидетельствует увеличение числа гамет в ацинусах и повышение жизнестойкости эмбрионов. Свет с длиной волны 520 нм тормозит развитие гонад морских ежей, т.е. снижает содержание оо- и сперматогониев, но при этом не нарушает структуру клеток. Изучение размножения морских ежей в контролируемых условиях позволило сделать вывод о том, что для получения жизнестойкой молоди морских ежей, с целью дальнейшего ее выращивания при различных биотехнологиях в морских хозяйствах, необходимо учитывать основные экологические факторы, являющиеся определяющими в жизнедеятельности этих животных.

Evdokimov V.V. Studies of the sea urchins spawning in aquaculture conditions in TINRO-Center // *Izv. TINRO*. — 2005. — Vol. 141. — P. 284–296.

Principal ecological factors (temperature, feeding, light) of sea urchins ontogenesis are analyzed as a part of biotechnology development for the sea urchins juveniles receiving in artificial conditions. The special attention is given to the description of a light factor: the changes in the sea urchins sexual glands under the light affect; the light influence on sexual processes; the influence of the light on the sea urchin productive possibilities.

The sea urchin gametes exposing to the light with different wavelengths accompanied with temperature stimulation may possess different capacities for reproduction and influence on viability of the young. The effect of certain wavelength on the sea urchins oogenesis and spermatogenesis is different: the light with the wavelength 720 nm activates the gonads development, while the light with the wavelength 520 nm has a suppressive effect by decreasing the oogonial and spermatogonial content without disturbing their cellular structure.

Conclusion is made that life resistance of the sea urchins juveniles growing at sea farms could be enhanced when taking into account the principal ecological factors of their reproduction.

Морские ежи, как объекты для экспериментальных исследований, прочно вошли в современную биологию. Хертвиг (Hertvig, 1876) впервые использовал половые клетки животных для изучения оплодотворения и доказал возможность

и абсолютную полноценность их в искусственных условиях. В последующие годы благодаря работам Пиарс (Pears, 1965), П.А.Мотавкина, В.В.Евдокимова (1975), В.Л.Касьянова с соавторами (1980), Г.А.Бузникова (1967, 1987), Ю.С.Хотимченко с соавторами (1993), Пиарс с соавторами (Pears et al., 1995), В.В.Евдокимова (1995), Деридович с соавторами (Deridovich et al., 1998), Лоуренсе (Lawrence, 2001) морские ежи в экспериментальных исследованиях стали использоваться особенно широко. Сейчас о развитии этих животных известно гораздо больше, чем о соответствующих процессах других организмов, поэтому эмбриогенез морских ежей служит моделью для решения разнообразных вопросов биологии и медицины. В последнее время особое внимание уделяется изучению воздействия определенных биотических и абиотических факторов на эти организмы в связи с их воспроизводством в искусственных и естественных условиях, с использованием интенсивных, экстенсивных и полунтенсивных методов их культивирования. При этом воздействие светового фактора на репродуктивный процесс морских ежей еще недостаточно исследовано, чтобы использовать его в практике воспроизводства этих животных с применением различных биотехнологий, в то время как другие основные экологические факторы — температурный и пищевой — изучены нами ранее (Мотавкин, Евдокимов, 1975; Евдокимов и др., 1993, 1997; Евдокимов, 1995, 1997; Deridovich et al., 1998; Евдокимов, Евдокимов, 2002). Биотехнология получения молоди морского ежа *Strongylocentrotus nudus* в контролируемых условиях (Евдокимов и др., 1993) вошла в мировые биотехнологии (Deridovich et al., 1998).

Настоящая работа посвящена изучению размножения морских ежей в контролируемых условиях в зависимости от светового фактора.

Световое излучение в диапазоне волн 295–800 нм играет важную роль в жизни организмов, воздействуя как на отдельные функции, так и на рост и развитие в целом (Голдсмит, 1977). Это позволяет предположить влияние света определенных длин волн на репродуктивный процесс гидробионтов, в частности морских ежей, при экстенсивном, интенсивном или полунтенсивном их воспроизводстве. В связи с этим возникают вопросы: 1) какие изменения происходят в половых железах культивируемых организмов; 2) каким образом у них осуществляется предполагаемое световое воздействие на половой процесс; 3) как это сказывается на продукционных возможностях. Ответы на эти вопросы являются актуальными в связи с рациональным ведением промысла морских ежей и их воспроизводством.

Успешное развитие морских хозяйств требует научного подхода для решения комплекса проблем, таких как определение действия основных экологических факторов на репродуктивный процесс гидробионтов в целом и на онтогенез морских ежей в частности.

В настоящее время основные закономерности гаметогенеза морских ежей успешно применяются для управления их репродуктивной активностью. Установлено, что с помощью метода температурной стимуляции половые клетки можно получать в любое время года (Мотавкин, Евдокимов, 1975; Евдокимов и др., 1993; Deridovich et al., 1998). Данный метод используется на заводах в Японии для получения молоди морских ежей, с последующим выращиванием их в море. С помощью этого метода мы решили установить воздействие света с определенными длинами волн на репродуктивный процесс морских ежей, принимая во внимание то, что световой фактор, наряду с температурным и пищевым, относится к разряду главных, обеспечивающих жизнь животных.

Исследования проводили на морских ежах *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*. Нами отмечены общие закономерности размножения этих животных в зависимости от воздействия света, и поэтому в данной работе во избежание повторений излагаем данные лишь по серому морскому ежу *S. intermedius*, которые в равной степени относятся и к черному *S. nudus*.

Исходя из анализа собственных (Евдокимов и др., 2001) и литературных данных (Pearse et al., 1995; Кафанов, Павлючков, 2001; Ручин, 2002) использовались определенные зоны спектров света. Выбранный свет соответствует местам обитания морских ежей в естественных условиях (от 300 до 800 нм). Для определения морфофункциональной оценки гамет и их потенциалов у ежей мы использовали стандартные абсорбционные светофильтры: ЗС-2, который поглощает все спектры света, кроме зеленого (495–550 нм), и КС-11, который поглощает все спектры света, кроме красного (675–770 нм). Красный свет мы условно обозначаем 720 нм, зеленый свет — 520 нм.

В работе представлены обобщенные результаты исследований с 1985 по 2004 г. При этом использованы также экспериментальные данные, не опубликованные ранее, полученные в опытах, проведенных с 1985 по 1988 г. на Морской экспериментальной базе о. Попова зал. Петра Великого (Японское море). Данные экспериментов анализировались и сравнивались с результатами, известными из мировой литературы.

Эксперименты проводились с использованием метода температурной стимуляции (Мотавкин, Евдокимов, 1975; Евдокимов и др., 1993). Этот метод удобен для экспериментального изучения регуляторных механизмов роста и созревания гамет морских ежей при промышленном их воспроизводстве, так как позволяет в любое время года иметь в достаточном количестве зрелые гаметы, которые можно использовать для различных экспериментальных исследований, а также для получения спата в хозяйствах марикультуры. Он относится к современным мировым биотехнологиям в области марикультуры (Deridovich et al., 1998).

Метод стимуляции гаметогенеза морских ежей заключается в том, что в сжатые сроки в лабораторных условиях воспроизводится ход изменения температуры воды естественной среды. Рассчитывается сумма градусо-дней, необходимая для созревания гамет у животных с учетом сезона года.

Весной гонадный индекс и объем половых клеток находится в линейной зависимости от температуры воды (Винберг, 1968).

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

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

где D — сумма градусо-дней; d — время, сут; t — температура окружающей среды, °C; t_0 — критическая температура, °C (Deridovich et al., 1998).

Стимуляция гаметогенеза морского ежа включала 3 периода.

1. Период адаптации к искусственной среде при температуре, соответствующей температуре воды в море.

2. Период гаметогенеза — сжатое воспроизведение естественного хода температур, при котором созревают гонады.

3. Период завершения гаметогенеза с помощью устойчивых температур, который зависит от уровня развития гонады.

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

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

Период завершения гаметогенеза составлял 7 сут.

Эксперименты на МЭБ о. Попова проводили в весенний период, когда ежи находились на стадии пролиферации — первая стадия, в течение трех лет. Всего поставлено 6 опытов, в которых исследовано 1440 серых морских ежей. В после-

дующие годы опыты по воздействию света ставили, когда животные находились на преднерестовой стадии.

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

В эксперименте было задействовано 8 аквариумов объемом по 20 л с проточной морской водой (с тремя повторностями), в которых помещалось по 30 животных. Три аквариума были полностью затемнены, в два из них подавался свет определенного спектра. Третий оставался затемненным и служил контролем для определения воздействия тепловых лучей. Один аквариум, четвертый, оставался незатемненным.

В незатемненном аквариуме животные подвергались температурной стимуляции при освещении белым светом, это мы принимали за контроль. В первом затемненном аквариуме ежей на фоне температурной стимуляции подвергали воздействию светом с длиной волны 720 нм, применяя светофильтр КС-11. Во втором затемненном аквариуме животных на фоне температурной стимуляции освещали светом с длиной волны 520 нм, используя для этого светофильтр ЗС-2. В третьем затемненном аквариуме ежи находились без освещения, только под воздействием температурной стимуляции.

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

Воздействие тепловых волн мы пытались анализировать используя для этой цели затемненные аквариумы, где содержали животных при постоянной температуре воды и подавали свет с длиной волны, как и при температурной стимуляции (в четырех аквариумах при трех повторностях).

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

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

Стадии развития гонады морского ежа определяли по шкале, предложенной Ю.С.Хотимченко с соавторами (1993).

Перед помещением животных в эксперимент для исследования использовали гонады от 10 самок и 10 самцов, при промежуточных наблюдениях из каждого аквариума брали по 5 особей обоего пола, оставшихся животных вскрывали в конце эксперимента. В начале опыта, на промежуточном этапе (через 15 сут после начала эксперимента) и в конце опыта (через 30 сут) у ежей определяли тургор, цвет и массу гонад, после чего для микроскопического изучения из половой желе-

зы вырезали кусочки ткани размером 5 x 5 мм, которые фиксировали в жидкости Буэна и 10 %-ном растворе нейтрального формалина. По общепринятой гистологической методике полученный материал заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали железным гематоксилином и гематоксилином Эрлиха с докраской 0,5 %-ным раствором эозина. Для оценки состояния гонад определяли средний объем ацинусов, половых клеток, их ядер и ядрышек по формуле эллипсоида: $V = n/6 \times A \times B^2$, где A — большой, B — малый диаметры.

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

У самцов выделяли зоны размножения, роста, формирования и зону, не занятую половыми клетками. Все полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, используя для статистической достоверности различия средних показателей (Лакин, 1980). Применяли критерии достоверности различий при уровне значимости $P = 0,05$. В работе взят параметрический критерий Стьюдента, так как в ней n больше 10. При уровне значимости 5 % наше значение критерия Стьюдента значительно превышает вышеуказанное, что свидетельствует о достоверности различий средних.

В конце эксперимента определяли плодовитость у морских ежей по методу С.Н.Яковлева (1987). Для подсчета яйцеклеток у самок после измерения диаметра панциря целиком удаляли яичники, определяли их объем в мерном цилиндре с морской водой и фильтровали через газ. Полученную суспензию, состоящую почти целиком из гамет, доводили до 100 мл и под биноклем в камере Богорова подсчитывали количество яйцеклеток, содержащихся в 1 мл конечной суспензии. Затем определяли общее количество яйцеклеток в яичниках одной самки.

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

Изучение раннего онтогенеза морского ежа проводили следующим образом. Половые продукты от половозрелых морских ежей получали у самок введением в перивисцеральную полость 0,5 мл 0,5 М раствора KCl. У самцов железу извлекали из перивисцеральной полости в чашку Петри; концентрированную сперму забирали микропипеткой. Осеменение проводили в следующем порядке. Яйца, суспензированные в морской воде, оседали, затем большая часть воды сливалась. Каплю «сухой» спермы разводили 5 мл морской воды. Разбавленную сперму смешивали с яйцеклетками. Через 1–2 мин суспензию разбавляли в 15 раз морской водой, и после оседания яйцеклеток воду заменяли новой. Дополнительно зиготы промывали два раза свежей морской водой (Мотавкин, Евдокимов, 1975).

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

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

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

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

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

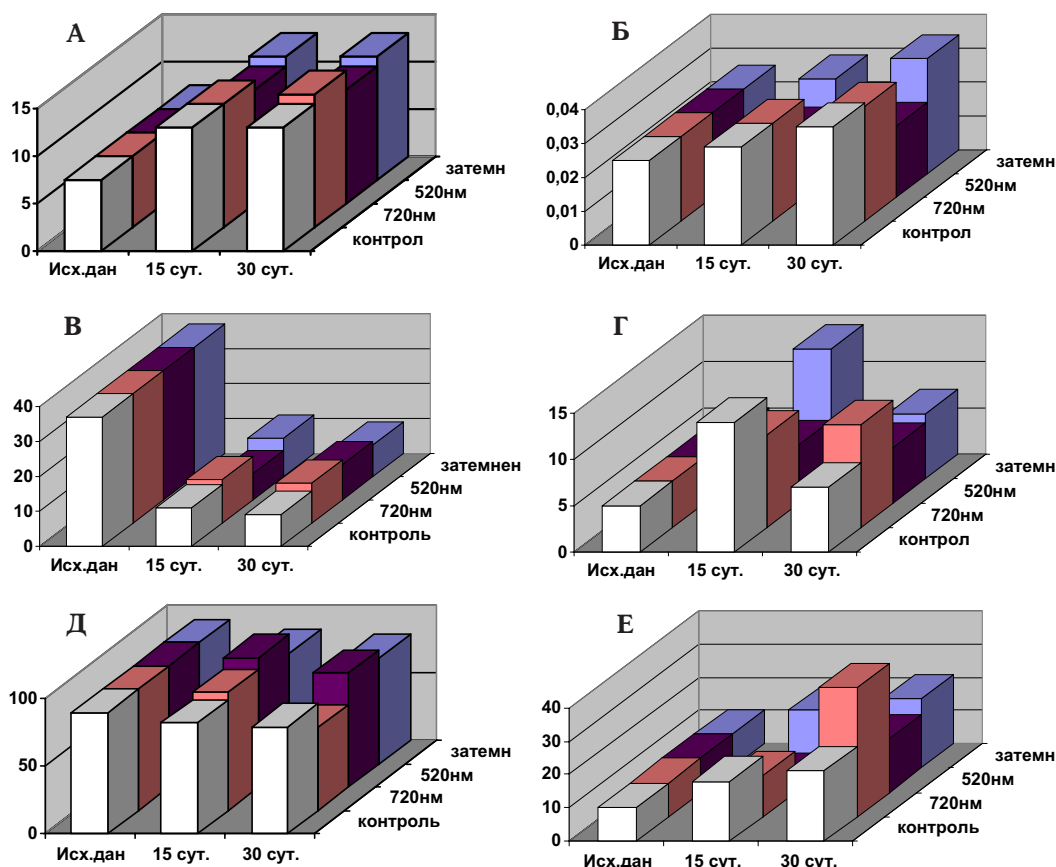


Рис. 1. Масса гонад, объем ацинусов, морфометрические показатели гамет морского ежа *S. intermedius* при температуре 4 °С: **А** — масса, г; **Б** — объем ацинусов в половой железе, мм³; **В** — количество пристеночных ооцитов в яичнике; **Г** — количество свободнолежащих ооцитов в яичнике; **Д** — количество сперматогоний в семеннике, %; **Е** — количество сперматозоидов в семеннике, %

Fig. 1. Morphometric parameters of gonads in *S. intermedius* при температуре 4 °С: **А** — gonadal mass, g; **Б** — acinar volume, mm³; **В** — parietal oocytes; **Г** — free oocytes; **Д** — spermatogonia, %; **Е** — spermatozoa, %

На фоне температурной стимуляции отмечается, что исследуемые длины волн оказывают различное воздействие на половые железы морских ежей в соответствии с законом Вант-Гоффа-Аррениуса (Проссер, Браун, 1977), т.е. скорость ферментативных реакций при повышении температуры на 1 °С возрастает на 9,6 %, что соответствует $Q_{10} = 2$.

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

В эксперименте, в сравнении с контролем, при воздействии светом 720 нм на фоне температурной стимуляции происходит увеличение массы половой железы. Нарастание массы гонад у животных зависит от длительности температурной стимуляции, от ее исходного состояния и влияния световой волны (рис. 2). У ежей вместе с массой гонад на фоне температурной стимуляции при световом воздействии в ходе экспериментов увеличиваются объемы акинусов (рис. 2).

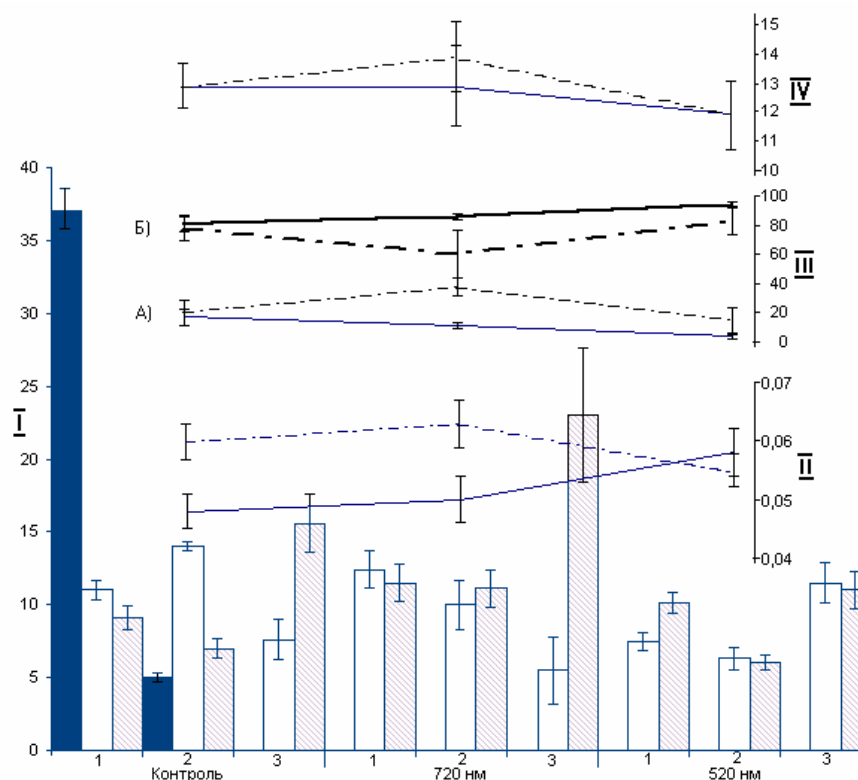


Рис. 2. Морфометрические показатели гонад самцов и самок *S. intermedius* при температурной стимуляции (контроль) и при освещении светом с длиной волны 720 и 520 нм на фоне температурной стимуляции. Темные столбики — перед началом опыта; светлые столбики — через 15 сут от начала опыта; заштрихованные столбики — через 30 сут от начала опыта. По оси абсцисс: 1 — пристеночные ооциты, 2 — свободные ооциты, 3 — зрелые яйцеклетки; по оси ординат: I — количество половых клеток в акинусе половой железы самки; II — объем акинусов в гонаде самок, мм³; III — количество клеточных элементов в акинусах половых желез самцов, А — сперматогонии, Б — сперматоциты, %; IV — масса гонад у самцов и самок. Сплошные линии на графиках II, III, IV — данные через 15 сут от начала опыта; штрих-пунктирные линии на тех же графиках — данные через 30 сут от начала опыта. Вертикальные отрезки — 95 %-ный доверительный интервал

Fig. 2. Morphometric parameters of gonads in *S. intermedius* males and females after temperature stimulation (control) and following illumination with light at wavelengths of 720 and 520 nm against a background of temperature stimulation. Dark columns — before the start of the experiment; light columns — 15 days, shaded columns — 30 days since the start of the experiment. Abscissa: 1 — parietal oocytes; 2 — free oocytes; 3 — mature ova; ordinate: I — gamete content in female gonad acinus; II — acinar volume in female gonad (mm³); III — cellular content in male gonad acini, A — spermatogonia, B — spermatocytes (%); IV — gonadal mass (g) in males and females. Continuous lines — data obtained 15 days the start of the experiment; dashed line — data obtained 30 days after the start of the experiment. Vertical bars — 99% confidence interval

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

Пристеночные ооциты — это клетки, преобладающие в начале опыта. В ходе эксперимента их число уменьшается и резко сокращается в конце опыта (рис. 2).

Число *свободнолежащих ооцитов* увеличивается в ходе опытов. Часть их во время экспериментов подвергается резорбции с образованием трофического субстрата, т.е. наблюдается то же, что происходит и в процессе естественного гаметогенеза. Различие заключается в том, что резорбция выросших клеток при воздействии красным и зеленым светом на фоне температурной стимуляции регистрируется на коротком отрезке времени и имеет более выраженный характер. Число свободнолежащих ооцитов заметно увеличивается на промежуточных этапах и сокращается к концу опытов (рис. 2).

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

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

Таким образом, масса гонад морских ежей, объем ацинусов, рост и созревание гамет свидетельствуют о том, что красный и зеленый свет на фоне температурной стимуляции оказывает определенное воздействие на половой процесс морских ежей, причем его проявление на процессы оо- и сперматогенеза различно: красный свет стимулирует, а зеленый — угнетает, что отражается на морфофункциональных показателях (рис. 2, 3).

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

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наименьшая плодовитость — $23,0 \pm 1,7$ млн яйцеклеток — у ежей из опыта, где животные содержались под воздействием зеленого света, наибольшая — $30,1 \pm 1,9$ млн яйцеклеток — при освещении ежей красным светом (рис. 4).

В процессе экспериментальных исследований установлено, что гаметы, полученные от ежей после содержания их под воздействием красного и зеленого света, обладают различной потенциальной возможностью. Это выражается в выживаемости эмбрионов в процессе прослеженного раннего онтогенеза. Минимальная доля отклонений от нормального развития (8 %) наблюдается у эмбрионов из гамет, полученных от ежей, содержавшихся при освещении светом длиной волны 720 нм. Максимальная доля аномалий (30 %) в ходе раннего онтогенеза у животных при воздействии на них светом с длиной волны 520 нм. Все это свидетельствует о том, что потенции гамет у морских ежей, сформировавшиеся под воздействием красного света, реализуются у организмов наиболее полно (рис. 5).

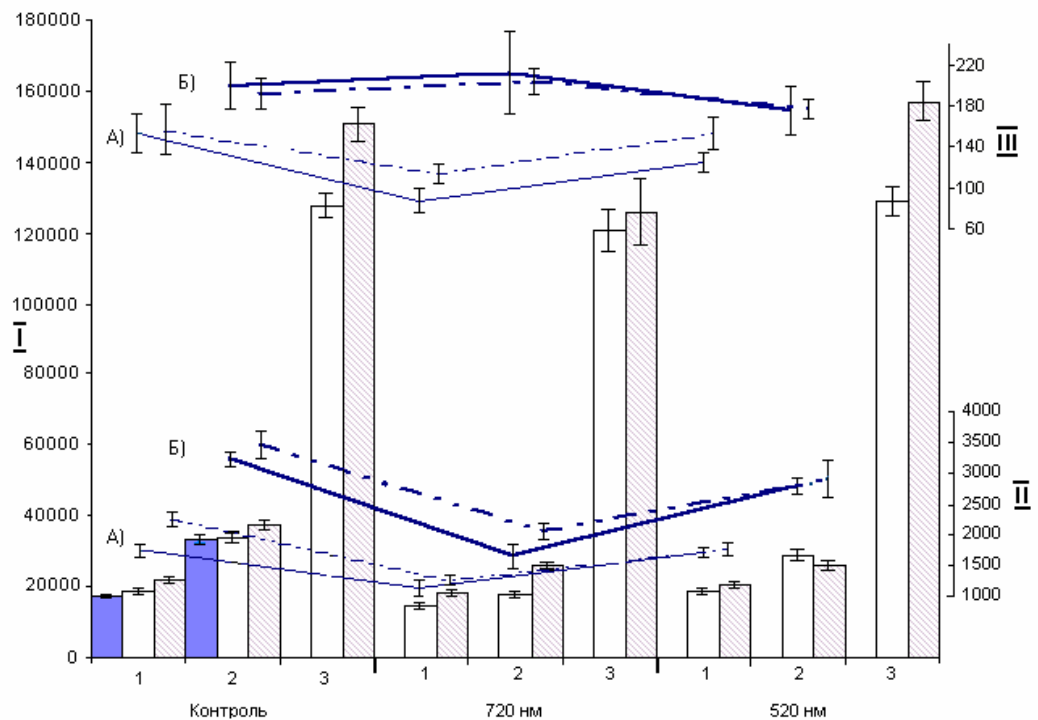
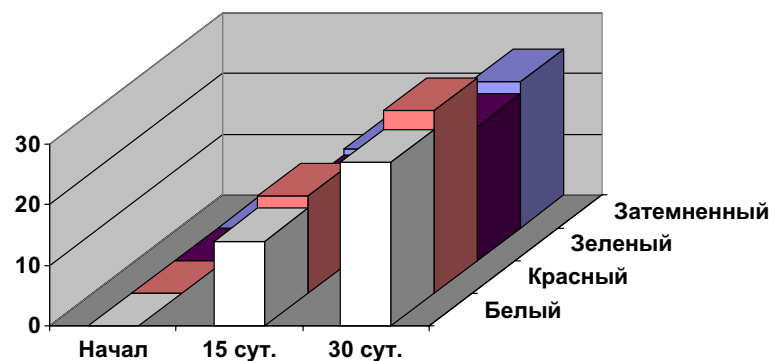


Рис. 3. Объем половых клеток (I, мкм³), их ядер (II, мкм³) и ядрышек (III, мкм³) у самок *S. intermedius* при температурной стимуляции (контроль) и при освещении светом с длиной волны 720 и 520 нм на фоне температурной стимуляции: А — пристеночные ооциты; Б — свободнолежащие ооциты. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

Fig. 3. Volume of gametes (I, mkm³), of their nuclei (II, mkm³) and of nucleoli (III, mkm³) in *S. intermedius* females after temperature stimulation (control) and following illumination with light at wavelengths of 720 and 530 nm against a background of temperature stimulation: A – parietal oocytes; B – free oocytes. Other designations are the same as in Fig. 2

Рис. 4. Плодовитость морского ежа *S. intermedius*

Fig. 4. Prolificacy of sea urchin *S. intermedius*



Заклучение

Запасы морских ежей у побережья Японского моря России составляют более 34 % запасов во всем дальневосточном бассейне (Кафанов, Павлючков, 2001). Интенсивный промысел этих животных ведется в нашей стране с 1990 г. Для того чтобы вести рациональный промысел морских ежей, необходима разработка биотехнологии для стабилизации численности их в популяциях. Решение этой проблемы лежит на пути получения жизнестойкой молоди морского ежа в искусственных условиях, используя вместе с применяемым промышленным методом —

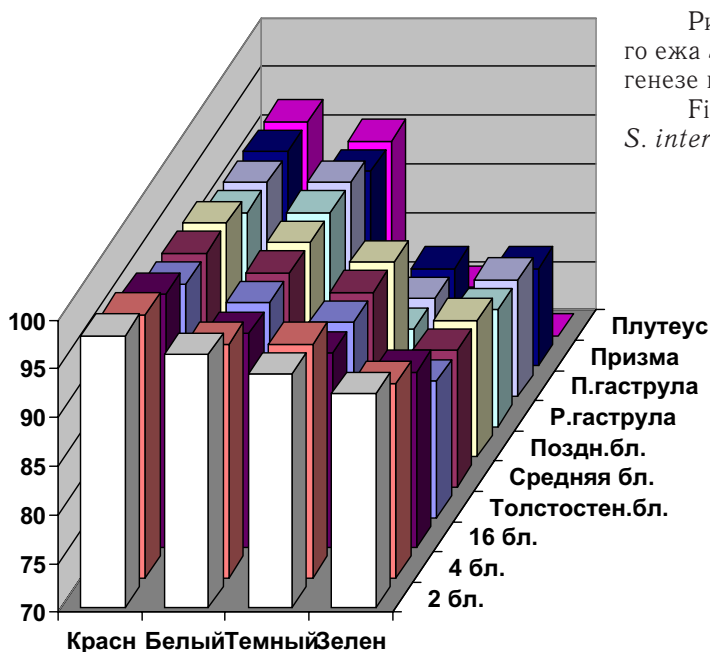


Рис. 5. Стадии развития морского ежа *S. intermedius* в раннем онтогенезе при различном освещении

Fig. 5. Ontogenesis of sea urchin *S. intermedius*

сбором спата на коллектора — известный метод температурной стимуляции гаметогенеза морских ежей (Мотавкин, Евдокимов, 1975; Евдокимов и др., 1993; Deridovich et al., 1998) с последующим расселением молоди в места обитания этих животных. Как в первом, так и во втором случаях пополнение сообществ ежами зависит от жизнестойкости расселяемой молоди, полученной из полноценных гамет этих животных. Повышать потенции гамет, формирующихся в гонадах морских ежей, необходимо созданием оптимальных экологических условий для их жизнедеятельности. Поэтому разведение этих промысловых организмов должно основываться на глубоких знаниях биологии вида и влияния на них основных экологических факторов внешней среды.

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

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

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

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

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

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

Свет с длиной волны 720 нм активизирует развитие гонад. Об этом свидетельствует увеличение таких показателей, как масса гонад, число половых клеток в ацинусах. У ежей увеличивается плодовитость, повышается жизнестойкость эмбрионов. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными других авторов, отмечающих положительное действие тепловых лучей на развитие организма (Рощупкин, Потапенко, 1977; Евдокимов и др., 2001).

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

Световые сигналы поступают в клетки морских ежей через сложный сенсорно-секреторный комплекс, находящийся на поверхности подий и иридофоры морских ежей, и служат, по-видимому, рефлектором кожных фоторецепторов (Евдокимов и др., 2001). Посредником между световым воздействием из окружающей среды и половым процессом морских ежей является нервная система. Ее нейроны секретируют разнообразные биологически активные вещества (биогенные моноамины, нейропептиды), которые доставляются к гонаде гуморальным путем и аксональным транспортом. Мишенью для нейропептидов считаются вспомогательные (фолликулярные) клетки, способные продуцировать стероидные гормоны (Хотимченко и др., 1993).

Половые стероидные гормоны в семенниках ежей ускоряют пролиферацию гониев, созревание сперматоцитов II, формирование сперматид и спермиев, а в яичниках — пролиферацию гониев, цито- и трофоплазматический рост за счет активации синтетических процессов как в половой железе, так и в самом ооците (Вараксин, 1994).

Мы полагаем, что свет с длиной волны 720 нм, по всей видимости, активизирует выработку стероидных гормонов, поскольку в наших опытах отмечается увеличение аналогичных параметров половой железы. В сравнении с контролем масса гонады больше на $2,0 \pm 0,3$ г, количество пристеночных ооцитов — на 4 %, свободнолежащих ооцитов — на 50 %, зрелых гамет — на 8 %. В семенниках количество сперматоцитов почти вдвое больше, чем в контроле, а зона формирования полностью занимает ацинус.

Плодовитость в опытах при освещении светом с длиной волны 720 нм увеличивается на $3,0 \pm 0,2$ млн в сравнении с контролем. Действие красного и зеленого света на жизнедеятельность морских ежей в конечном итоге отражается на жизнестойкости эмбрионов, которые развиваются из гамет, обладающих различной потенциальной возможностью. Это объясняется, по всей видимости, тем, что, согласно литературным данным (Хотимченко и др., 1993; Вараксин, 1994), формирующиеся в ооците пепти- и стероидергические системы сохраняются после его созревания и начинают функционировать в раннем эмбриогенезе, осуществляя регуляцию развития.

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

Проведенные нами исследования позволяют ответить на вопрос, который стоит перед морскими хозяйствами и от правильного ответа на который зависит ус-

пешное развитие прибрежного рыболовства. Специалистам, занимающимся разведением гидробионтов, необходимо знать, какая стадия жизненного цикла промыслового объекта (в данном случае морского ежа) лимитирует формирование запасов и какие мероприятия при этом следует проводить. Согласно литературным данным (Tegner, 1989), основными лимитирующими факторами являются: 1) развитие гонад; 2) гибель личинок; 3) выживаемость молоди. Мы считаем, что первый фактор — основополагающий, т.е. количество полноценных гамет, формирующееся у морских ежей, в значительной мере определяет успешное развитие прибрежного рыболовства. Это согласуется с литературными данными (Евдокимов и др., 1997; Deridovich et al., 1998).

Таким образом, для получения жизнестойкой молоди морских ежей, с целью дальнейшего ее выращивания при различных биотехнологиях в морских хозяйствах, необходимо учитывать основные экологические факторы, являющиеся определяющими в жизнедеятельности этих животных.

Литература

- Бузников Г.А.** Низкомолекулярные стимуляторы зародышевого развития. — М.: Наука, 1967. — 265 с.
- Бузников Г.А.** Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. — М.: Наука, 1987. — 232 с.
- Вараксин А.А.** Регуляторные пептиды и половые стероидные гормоны в регуляции размножения двустворчатых моллюсков и морских ежей: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Владивосток, 1994. — 53 с.
- Винберг Г.Г.** Рост, скорость развития и плодовитость в зависимости от условий среды // Методы определения продукции водных животных. — Минск: Наука и техника, 1968. — С. 45–71.
- Голдсмит Т.** Фоторецепция и зрение. Сравнительная физиология животных. — М.: Мир, 1977. — 480 с.
- Евдокимов В.В.** Онтогенез морского ежа в лабораторных и природных условиях / ТИНРО-центр. — Владивосток, 1997. — Деп. во ВНИЭРХ, № 1312.
- Евдокимов В.В.** Репродуктивный процесс и продукционные возможности гидробионтов искусственного сообщества // Онтогенез. — 1995. — Т. 26, № 5. — С. 361–369.
- Евдокимов В.В., Бирюкова И.В., Евдокимов А.В.** Воздействие света с различной длиной волны на гаметогенез черного морского ежа (*Strongylocentrotus nudus*) // Морфология. — 2001. — Т. 120, № 6. — С. 75–79.
- Евдокимов В.В., Викторовская Г.И., Бирюкова И.В.** Биотехнология получения молоди морского ежа *Strongylocentrotus nudus* в контролируемых условиях. — Владивосток: ТИНРО, 1993. — 16 с.
- Евдокимов В.В., Евдокимов А.В.** Взаимодействие гидробионтов в поликультуре при воспроизводстве в контролируемых условиях // Изв. ТИНРО. — 2002. — Т. 131. — С. 373–380.
- Евдокимов В.В., Родин В.Е., Викторовская Г.И., Павлючков В.А.** Размножение морских ежей и приморского гребешка в прибрежных сообществах Японского моря // Онтогенез. — 1997. — Т. 28, № 1. — С. 49–54.
- Касьянов В.Л., Медведева Л.А., Яковлев Ю.М., Яковлев С.Н.** Размножение иглокожих и двустворчатых моллюсков. — М.: Наука, 1980. — 204 с.
- Кафанов А.И., Павлючков В.А.** Экология промысловых морских ежей рода *Strongylocentrotus* материкового япономорского побережья России // Изв. ТИНРО. — 2001. — Т. 128. — С. 349–373.
- Лакин Г.Ф.** Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 184 с.
- Мотавкин П.А., Евдокимов В.В.** Получение у морского ежа в искусственных условиях зрелых половых клеток и их функциональная характеристика // Биол. моря. — 1975. — № 1. — С. 58–67.
- Проссер Л., Браун Ф.** Сравнительная физиология животных. — М.: Мир, 1977. — Т. 1. — 608 с.
- Рощупкин Д.И., Потапенко А.Я.** Биологическое действие ультрафиолетового и видимого излучения // Внешняя среда и развивающийся организм. — М.: Наука, 1977. — С. 53–90.
- Ручин А.Б.** Влияние отдельных монохроматических зон спектра на рост карася *Carassius carassius* // Всерос. конф. молодых ученых, посвященная 140-летию со дня рождения Н.М.Книповича: Тез. докл. — Мурманск ПИНРО, 2002. — С. 169–170.

Хотимченко Ю.С., Дерилович И.И., Мотавкин П.А. Биология размножения и регуляция гаметогенеза и нереста у иглокожих. — М.: Наука, 1993. — 168 с.

Яковлев С.Н. Плодовитость морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и методы ее оценки // Биол. моря. — 1987. — № 5. — С. 46–52.

Deridovich I.I., Motavkin P.A., Evdokimov V.V. et al. Marine biotechnology. Vol. 1: Endocrinology and Reproduction. — New Delhi; Calcutta: Oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD, 1998. — 78 p.

Hertvig O. Beitrage zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen // Eies. Morphol. Jahr. — 1876. — Vol. 1. — P. 347–434.

Lawrence J.M. Edible sea urchins: biology and ecology. — Amsterdam; L., 2001. — 419 p.

Pears J.S. Reproductive periodicities in several contrasting populations of *Odontaster validus* Koehler, a common antarctic asteroid // Biology of the Antarctic Seas. 2. Antarctic Res. Ser. — 1965. — Vol. 5. — P. 39–85.

Pears J.S., Beyer D., Steele M.E. Both photoperiod and diet influence resource partitioning between somatic and gonad growth in sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*) // Amer. Zool. — 1995. — Vol. 35, № 5. — P. 109.

Tegner J.M. The Feasibility of Enhancing Red Sea Urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, Stocks in California: An Analysis of the Options // Marine Fisheries. — 1989. — Vol. 5. — P. 1–22.

Поступила в редакцию 01.03.05 г.