

ЗОГРАФ  
ЮЛИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**Ультраструктура мужской половой системы  
и сперматозоидов у свободноживущих морских нематод  
из отряда Chromadorida**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

03.00.08 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2006

**Работа выполнена в Институте биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН  
и на кафедре зоологии Академии экологии, морской биологии и биотехнологии  
Дальневосточного государственного университета**

**Научные руководители:**

доктор биологических наук  
Юшин Владимир Владимирович

кандидат биологических наук, доцент  
Дащенко Ольга Ивановна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
Долматов Игорь Юрьевич

кандидат биологических наук  
Темерева Елена Николаевна

**Ведущая организация:**

Институт паразитологии РАН

Защита состоится «**28**» декабря 2006 г. в **10 часов** на заседании диссертационного  
совета Д 005.008.01 при Институте биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (4232) 310-900

e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

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

Автореферат разослан «\_\_\_» ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.А. Ващенко

## Общая характеристика работы

**Актуальность исследования.** Нематоды – одна из самых многочисленных и широко распространенных групп многоклеточных животных, освоивших гигантский диапазон сред обитания и находящихся на стадии активного биологического прогресса (Малахов, 1986). Причина этого прогресса заключается в особенностях тканевого и клеточного строения, а также в особенностях размножения нематод.

До сих пор в научной литературе сохраняется дисбаланс данных по тонкому строению нематод и связан он в основном с тем, что свободноживущие нематоды, составляющие большую часть разнообразия класса и играющие огромную роль в морских экосистемах, изучались лишь эпизодически (Bird, Bird, 1991; Wright, 1991; Justine, 2002). В то же время, свободноживущие морские нематоды включают таксоны, сохранившие большое число плезиоморфных признаков, анализ которых дает богатый материал для решения вопросов сравнительной цитологии и гистологии (Малахов, 1986).

Нематоды из отряда Chromadorida составляют важную часть биоразнообразия морского мейобентоса, а основные группы хромадорид легко доступны из проб, взятых в любой части прибрежных вод мирового океана. В то же время, данных по гистологии и ультраструктуре хромадорид в мировой литературе очень мало, поэтому хромадориды и были выбраны в качестве объекта для настоящего исследования.

До сих пор микроскопическая анатомия мужской половой системы свободноживущих морских нематод остаётся неизученной, что затрудняет интерпретацию светооптических данных с точки зрения сравнительной анатомии и филогении нематод. В связи с этим первой частью работы стала электронно-микроскопическая реконструкция зачатка половой системы у личинки первой стадии и мужской половой системы взрослых свободноживущих морских нематод на примере представителей отряда Chromadorida.

Электронно-микроскопические исследования строения и развития аберрантных спермиев нематод важны для понимания биологии мужских гамет беспозвоночных животных в целом и, в то же время, позволяют проводить сравнительно-цитологический анализ для построения естественной системы класса. Такой анализ, наряду с современными данными по микроскопической анатомии, эмбриологии и молекулярной генетике нематод, открывает новые пути к построению естественной системы крупных таксонов класса. Новые данные по развитию спермиев нематод интересны также в рамках более широких исследований закономерностей формирования аберрантных спермиев беспозвоночных с внутренним оплодотворением. В связи с этим особое внимание уделяется процессам развития специфических для спермиев нематод мембранных органелл (МО) и фиброзных тел (ФТ), судьбе митохондрий и центриолей, цитоплазматическим перестройкам

активированных спермиев, строению и составу цитоскелета спермиев. Сравнительный анализ этих данных позволяет понять основные пути цитологических перестроек спермиев беспозвоночных, связанные с переходом к внутреннему оплодотворению и необходимостью длительного сохранения в половых путях самок.

К началу исследований сведения по ультраструктуре сперматозоидов нематод-хромадорид ограничивались единственной статьей (Yushin, Coomans, 2000), в которой на примере двух видов из сем. Chromadoridae был описан сперматогенез и показана полная редукция мембранных органелл (МО) и фиброзных тел (ФТ), компонентов, типичных для aberrantных спермиев нематод. Эти данные, интересные как с точки зрения сравнительной цитологии, так и филогении, было важно проверить и оценить, расширив круг исследуемых нематод для сравнительного анализа.

**Цели и задачи работы.** Основной целью настоящей работы было исследование ультраструктуры мужской половой системы и спермиев свободноживущих морских нематод из отряда Chromadorida. На основе оригинальных данных предполагалось реконструировать гистологию мужской половой системы и провести сравнительно-цитологический и филогенетический анализ сперматозоидов хромадорид.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить клеточный состав и ультраструктуру зачатка половой системы у личинки первой стадии *Halichoanolaimus sonorus*.
2. Изучить строение мужской половой системы на примере *Paracyatholaimus pugettensis* и ряда других хромадорид.
3. Изучить строение и развитие спермиев у представителей трех семейств отряда Chromadorida (Cyatholaimidae, Selachinematidae, Chromadoridae).
4. На основе полученных данных провести сравнительно-цитологический анализ сперматозоидов хромадорид и других нематод.
5. Оценить возможность использования данных по строению и развитию спермиев хромадорид для анализа филогении отряда.

**Научная новизна.** Впервые исследован зачаток половой системы у нематод отряда Chromadorida. Показано, что зачаток представлен четырьмя клетками: двумя первичными половыми клетками и двумя соматическими клетками, предшественниками будущей соматической составляющей половой системы. Показано, что в первичных половых клетках отсутствуют характерные для нематод Р-гранулы – маркеры первичных половых клеток, известные для нематод-рабдитид.

Впервые проведено ультраструктурное исследование мужской половой системы свободноживущих морских нематод. Показано, что стенка семенника образована

эпителиальными клетками, при этом на конце семенника располагается крупная концевая клетка, формирующая отростки, проникающие между сперматогониями. Семенной пузырек сформирован эпителиальными клетками, проявляющими как железистую, так и абсорбционную активность. Семявыносящий проток состоит из двух рядов железистых клеток и лишен морфологически различимой полости.

Впервые описаны основные стадии развития спермиев у пяти свободноживущих морских нематод отряда Chromadorida: *Paracyatholaimus pugettensis*, *Paracanthochus macrodon*, *Halichoanolaimus sonorus*, *Neochromadora poecilosoma* и *Steineridora borealis*. Описано два паттерна строения и развития спермиев нематод-хромадорид: (1) спермии, в которых формируются только ФТ, а МО отсутствуют; (2) спермии с полной редукцией аберрантных органелл. Показано, что распределение паттернов среди семейств хромадорид не коррелирует с современными системами отряда.

На основе оригинальных данных и анализа мировой литературы впервые показано наличие в спермиях нематод уникального компонента цитоскелета – микротрубочкоподобных волокон (МПВ) сформированных белком MSP (major sperm protein), уникальным белком, характерным исключительно для сперматозоидов нематод.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Анализ строения и развития спермиев нематод может быть полезен для понимания процессов формирования половых клеток у многоклеточных животных, а так же путей возникновения аберрантных сперматозоидов. Полученные в ходе исследования данные могут быть направлены на разработку естественной системы класса Nematoda, являющейся научной основой для прикладной нематологии как раздела гельминтологии. Представленные в диссертации результаты о развитии и строении половой системы нематод могут быть включены в программу общих и специализированных курсов по цитологии, биологии развития, гистологии и зоологии беспозвоночных животных для высших учебных заведений.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на II конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего Востока России (Владивосток, ДВГУ, 1999); IV региональной конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего Востока России (Владивосток, ДВГУ, 2001); итоговой конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные исследования морской биоты (биология, химия и биотехнология)» (Владивосток, ДВГУ, 2002); V международном симпозиуме Российского нематологического общества (Владивосток, ИБМ ДВО РАН, 2003); ежегодной всероссийской конференции Научно-образовательных центров (Казань, КГУ, 2004); VI

международном симпозиуме Российского нематологического общества (Москва, ИП РАН, 2005); XXVIII Международном симпозиуме Европейского общества нематологов, (Благоевград, Болгария, 2006); на семинарах кафедры зоологии ДВГУ и лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 5 статей, включая 2 статьи в журналах из списка ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендуемых ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 146 источников, из которых 129 на иностранных языках.

Приложение включает 19 оригинальных схематических рисунков и 66 фотографий.

**Благодарности.** Автор выражает благодарности своим научным руководителям В.В. Юшину и О.И. Дашенко за многолетнюю помощь, терпение, идейную поддержку и заботу на всех этапах выполнения работы. Всему коллективу лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН и кафедры зоологии ДВГУ за создание теплой обстановки, приносящей дополнительную радость от работы. Выражаю благодарность за помощь в работе с электронными микроскопами Д.В. Фомину. Спасибо всему коллективу Международных нематологических курсов (PINС, University of Gent, Belgium) за новый взгляд на нематологию и науку в целом, а так же Леониду Русину, без которого знакомство с этими курсами никогда бы не состоялось.

Отдельно хочется поблагодарить д.б.н. Н.П. Фадееву за «знакомство» с нематодами, вылившееся в любимую и интересную работу. Спасибо С.Э. Спиридонову за помощь и моральную поддержку при работе с энтомопатогенными нематодами.

Спасибо моим родителям, поддерживающим меня во всех моих начинаниях, а так же К.В. Яковлеву за конструктивную критику, техническую помощь и моральную поддержку.

Работа поддержана грантами CRDF, ДВО (06-III-A-06-173, 06-III-B-06-201) и РФФИ (05-04-48268 и 06-04-96039)

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

В главе приводятся сведения о строении полового зачатка, половой системы и сперматозоидов нематод. Делается вывод о неизученности развития и строения половой

системы свободноживущих нематод, а также о слабой изученности сперматогенеза и спермиев нематод-хромадорид.

### Материал и методика

Объектами изучения в настоящей работе были шесть видов свободноживущих морских нематод отряда Chromadorida, принадлежащих к двум подотрядам и трем семействам (используется система крупных таксонов нематод, разработанная Малаховым, Рыжиковым и Сониным (1982) и Малаховым (1986).

#### Подотряд Cyatholaimina

Cyatholaimidae: *Paracanthonchus macrodon* Weiser et Hopper, 1967

*Paracyatholaimus pugettensis* (Ditlevsen, 1919)

Selachinematidae: *Halichoanolaimus sonorus* Belogurov et Fadeeva, 1980

#### Подотряд Chromadorina

Chromadoridae: *Neochromadora poecilosoma* (De Man) Mykoletzky, 1924

*Panduripharynx unidentatus* Kito, 1977

*Steineridora borealis* Platonova, 1971

Сборы нематод производили на илистой отмели в окрестностях МБС «Восток» Института биологии моря ДВО РАН в период с 1998 по 2003 гг.

Для изучения сперматогенеза, а также строения семенника, живым особям нематод отрезали головной и хвостовой концы тела так, чтобы в оставшейся части была расположена гонада. Хвостовые концы тела нематод были зафиксированы для исследования семявыносящих протоков половой системы.

Для исследования полового зачатка и первичных половых клеток хромадорид в качестве примера был выбран вид *Halichoanolaimus sonorus* (Selachinematidae). Для получения личинок 1 стадии ставилось развитие. Для этого самок разрезали в районе вульвы, после чего яйца обычно выталкивались внутренним давлением из животного в морскую воду. Яйца помещали в каплю воды на покровное стекло. Стёкла с развивающимися эмбрионами содержались в чашках Петри с морской водой при температуре 18-20°C. Развитие завершалось на 11-12-й день вылуплением личинок 1 стадии из яйцевых оболочек.

Полученные образцы фиксировали в 2.5% глутаральдегиде, после чего вторично фиксировали в 2% растворе тетроксиде осмия на том же буфере. После осмирования образцы обезживали в серии спиртов и перемещали в смеси изопропанола и смол Спурра (Spurr, Sigma). Тонкие срезы толщиной 50-70 nm были сделаны на ультратоме

Riechert Ultracut E. Срезы помещали на бленды с формваровой подложкой и окрашивали 1% водным уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные препараты изучали на трансмиссионных электронных микроскопах JEOL JEM 100B и JEOL JEM 100S.

Общую морфологию половой системы и сперматозоидов изучали на микроскопе Reichert Polyvar с помощью оптики Номарского. Некоторые детали внутренней морфологии сперматозоидов наблюдали методом эпифлуоресценции, для чего спермии окрашивали раствором акридинового оранжевого в морской воде. Для наблюдения и фотографирования использовали голубой фильтр В1/455-490.

## Результаты

**Зачаток половой системы.** Зачаток половой системы личинки первой стадии *Halichoanolaimus sonorus* состоит из четырех клеток, две из которых являются первичными половыми клетками (ППК), а две другие – зачатками соматической компоненты гонады (Рис. 1). ППК – это одинаковые по строению (5-6 мкм в диаметре) округлые клетки (Рис. 1). Одной своей частью они обращены к соматической мускулатуре, а противоположной – вдаются в кишечник. Крупные ядра (3-4 мкм в диаметре) с единственным сферическим ядрышком (0.5 мкм) занимают большую часть объема клетки. Митохондрии, а так же частицы электроноплотной диффузной субстанции плотно прилегают к ядру. Поверхность клетки относительно гладкая.

На серийных срезах можно проследить, что обе первичные половые клетки плотно соприкасаются друг с другом, а так же с соседними соматическими клетками – предшественниками соматической компоненты гонады (Рис. 1). Это удлиненные клетки, ядро которых повторяет их форму. Цитоплазма соматических клеток заполнена свободными рибосомами, цистернами эндоплазматического ретикулюма и аппарата Гольджи, митохондриями и мелкими пузырьками.

**Мужская половая система.** У самцов *Paracyatholaimus pugettensis* имеется только один передний семенник (Рис. 2), располагающийся справа от кишки. Семенник впадает в семявыносящий проток, который открывается в клоаку через эякуляторный канал. В клоаке залегают парные спиккулы и рулек. Сходным образом устроена половая система *N. poecilosoma* и *S. borealis* (Chromadoridae), тогда как у *Paracanthonus macrodon* и *H. sonorus* имеются два противоположных семенника, объединенных общим семяпроводом.

В слепой части каждого семенника *Paracyatholaimus pugettensis* можно обнаружить уплощенную дистальную концевую клетку с крупным ядром, митохондриями и



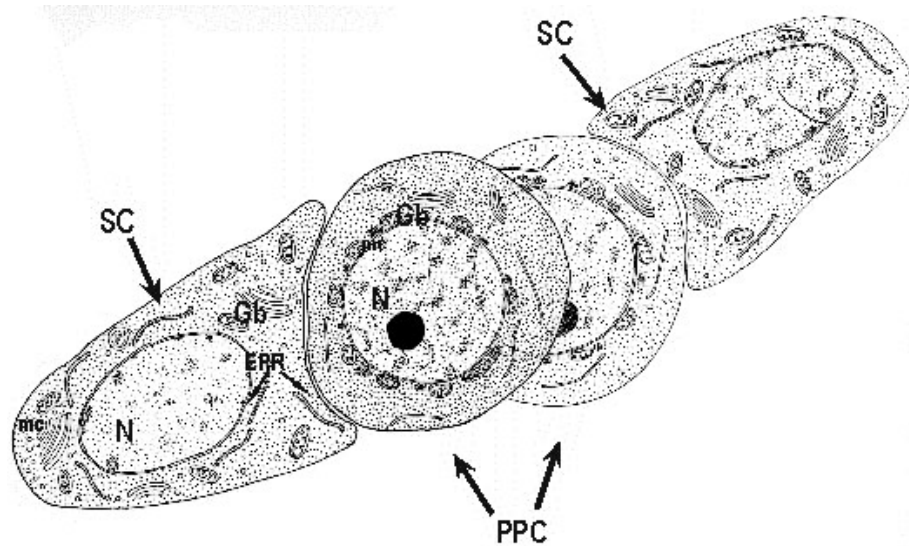


Рис. 1. Схема полового зачатка личинки первой стадии *Halichoanolaimus sonorus*. EPR – эндоплазматический ретикулум, Gb – аппарат Гольджи, mc – митохондрии, N – ядро, PPC – первично-половые клетки, SC – соматические клетки полового зачатка.

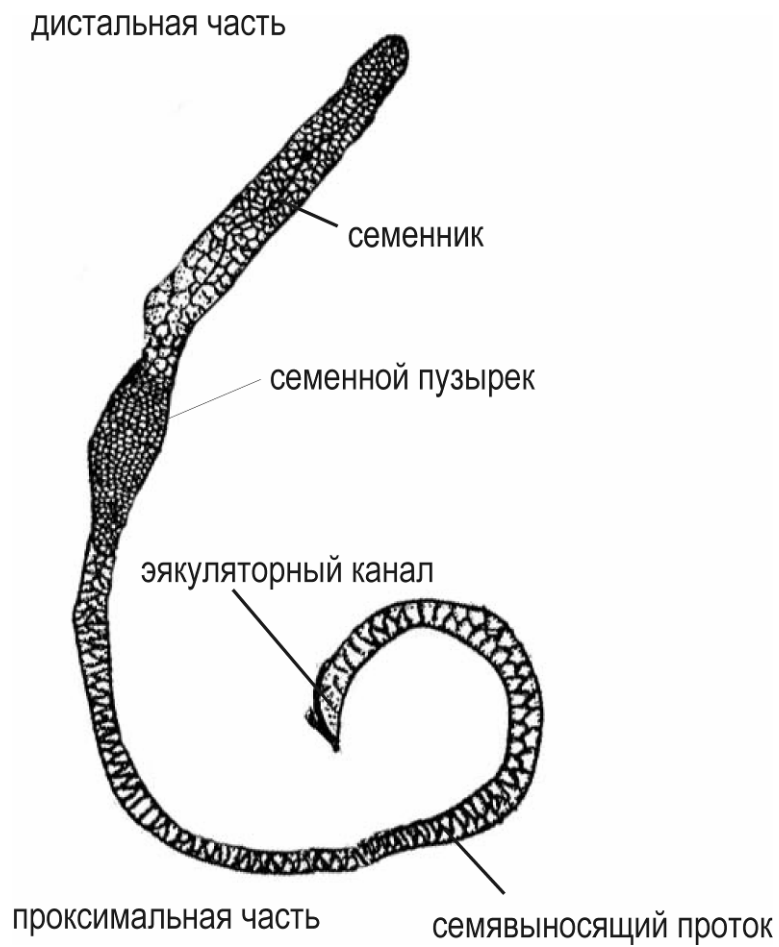


Рис. 2. Схема половой системы *Paracyatholaimus pugettensis*.

цистернами эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Сходным строением характеризуются концевые клетки у *Panduripharynx unidentatus*.

Стенка семенника *Paracyatholaimus pugettensis* сформирована соматическими эпителиальными клетками. Это полигональные клетки, своими отростками глубоко проникающие между развивающимися половыми клетками. По мере продвижения к проксимальной части семенника, эпителиальные клетки становятся тоньше. Стенка семенника у *N. poecilosoma* и *H. sonorus* представлена сильно уплощенными эпителиальными клетками.

Семенной пузырек *Panduripharynx unidentatus* и *Halichoanolaimus sonorus* образован крупными эпителиальными клетками с выраженной секреторной активностью и резорбционной активностью. Клетки семенного пузырька *Halichoanolaimus sonorus* находятся в тесном контакте с мышечными клетками.

Семяпровод *Paracyatholaimus pugettensis* сформирован двумя рядами железистых клеток, расположенных в черепичном порядке. По обе стороны от протока располагаются пучки V-образных мышц, берущих свое начало от боковых стенок тела и сходящихся в области брюшного гиподермального валика. Семяпровод округлый в сечении и лишен просвета. Диаметр его уменьшается по мере продвижения от семенника к клоаке, последняя треть протока окружена плотным кольцом мышц. Отличительной особенностью семявыносящего протока *Panduripharynx unidentatus* является наличие миоэпителиальных клеток в его дистальной части.

Проксимальная часть протока – эякуляторный канал – у *Paracyatholaimus pugettensis* слегка уплощен в поперечном сечении и окружен мышцами. По обе стороны от него располагаются простатические железы, протоки которых открываются в клоаку. Последняя выстлана кутикулой и отделена от кишечника сфинктером. В отдельном дорзальном кармане располагаются парные спиккулы.

**Сперматозоиды хромадорид.** Сперматогонии (Рис. 3) – недифференцированные клетки, устроенные примерно одинаково у нематод. Это полигональные клетки около 6 мкм в диаметре, расположенные небольшой группой в слепой дистальной части семенника. Центральную часть клетки занимает крупное (3-4 мкм в диаметре) ядро, а цитоплазма клетки заполнена митохондриями, цистернами эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, а так же свободными рибосомами. Поверхность клеток гладкая, лишенная каких-либо специальных образований.

#### **Семейство Cyatholaimidae**

*Paracyatholaimus pugettensis*. Сперматоциты – крупные полигональные клетки, проявляющие высокую биосинтетическую активность. Крупное ядро окружено ядерной

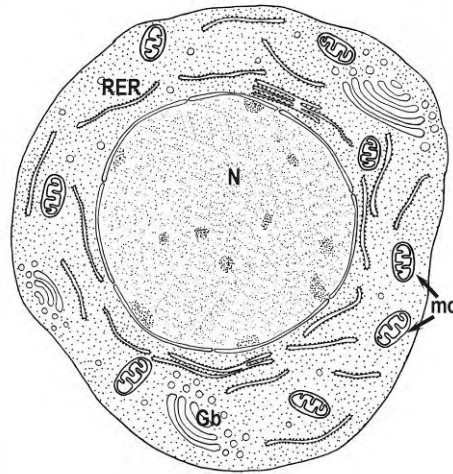
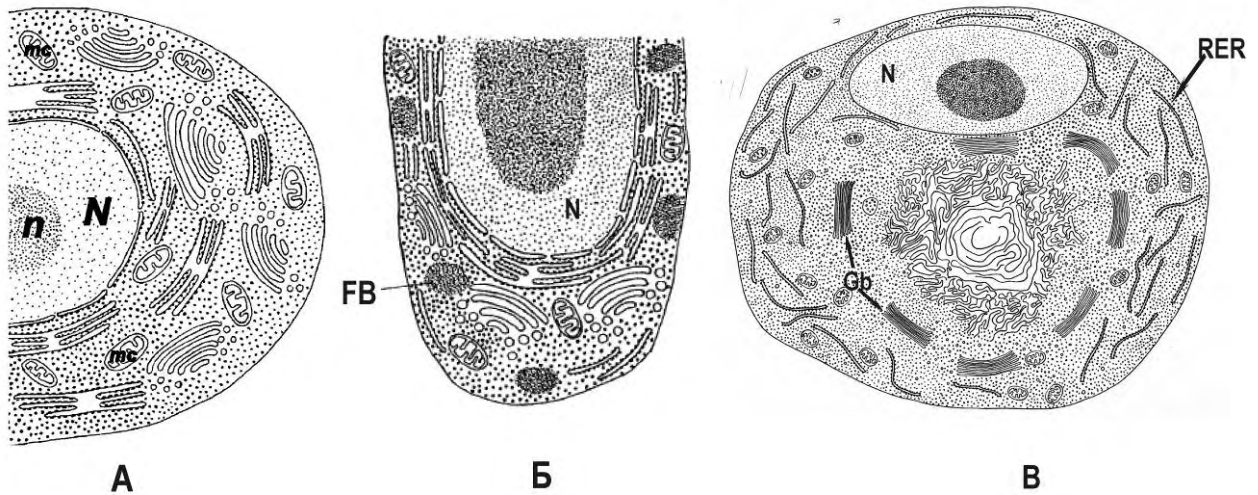
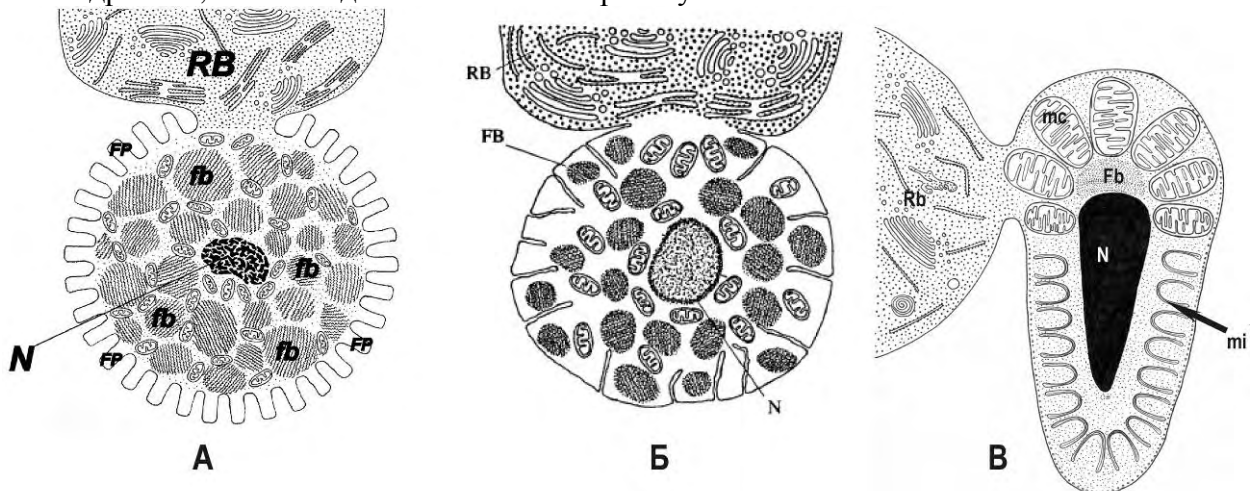


Рис. 3. Схема сперматогония.

Gb – аппарат Гольджи, mc – митохондрии, N – ядро, RER – эндоплазматический ретикулум.

Рис. 4. Схема сперматоцитов хромадрид. А – *Halichoanolaimus sonorus*, Б – *Neochromadora poecilosoma*, В – *Steineridora borealis*.

FB – фиброзные тела, Gb – аппарат Гольджи, mc – митохондрии, N – ядро, n – ядрышко, RER – эндоплазматический ретикулум.

Рис. 5. Схема сперматид. А – *Paracyatholaimus pugettensis*, Б – *Neochromadora poecilosoma*, В – *Steineridora borealis*.

Fb, FB – фиброзные тела, FP – филоподии, mc – митохондрии, mi – впячивания наружной мембраны, N – ядро, Rb, RB – резидуальное тело.

оболочкой, цитоплазма заполнена хорошо развитым синтетическим аппаратом, включающим многочисленные свободные рибосомы, цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Результатом синтетической активности клетки являются многочисленные сгустки плотного фиброзного материала – предшественники фиброзных тел (ФТ).

Сперматиды (Рис. 5А) – крупные клетки, состоящие из резидуального тела и главного тела клетки (ГТК), соединенных друг с другом посредством цитоплазматического мостика. В ГТК располагается ядро, лишенное ядерной оболочки, хроматин которого сильно конденсирован и представлен плотными сгустками. Ядро окружено митохондриями и ФТ. Плазмалемма ГТК формирует многочисленные филоподии. Весь синтетический аппарат клетки вынесен в резидуальное тело.

Незрелые спермии *Paracyatholaimus pugettensis* (Рис. 6А) морфологически сходны с ГТК сперматид. Это округлые клетки с ядром без ядерной оболочки, окруженным ФТ и митохондриями. Поверхность спермиев формирует ламеллоподии. Цитоплазма клетки заполнена микротрубочкоподобными волокнами, диаметром около 16 нм.

Зрелые спермии из матки *Paracyatholaimus pugettensis* (Рис. 7А), – это амебоидные клетки с передней псевдоподией и задним ГТК, в котором располагается ядро, рядом с которым часто можно обнаружить центриоли, остатки ФТ, митохондрии и включения. Псевдоподия заполнена элементами цитоскелета. Ни на одной из стадий сперматогенеза *Paracyatholaimus pugettensis* не формируются мембранные органеллы или сходные с ними структуры.

***Paracanthonchus macrodon*.** Округлые незрелые спермии (Рис. 6Б) формируют многочисленные филоподии, в центре клетки расположено ядро, окруженное митохондриями. ФТ в цитоплазме отсутствуют, а вся она заполнена микротрубочкоподобными волокнами диаметром от 13 до 16 нм.

Поляризация активированных спермиев из матки *Paracanthonchus macrodon* (Рис. 7Б) выражена слабо. Ядро спермиев окружено митохондриями, а цитоплазма заполнена микротрубочкоподобными волокнами (Рис. 8). Отличительной особенностью зрелых спермиев *Paracanthonchus macrodon* является их способность формировать плотные контакты со стенкой матки (Рис. 7Б, 8А), в образовании которых принимают участие микротрубочкоподобные волокна. В спермиях *Paracanthonchus macrodon* не обнаружены ФТ, МО или сходные с ними структуры.

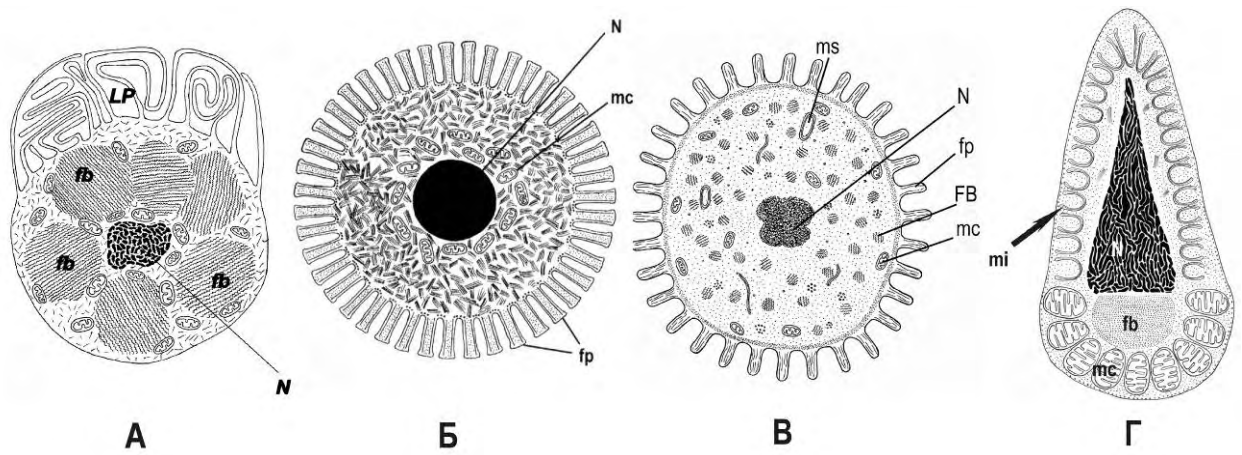


Рис. 6. Схема строения спермиев хромадорид. А – *Paracyatholaimus pugettensis*, Б – *Paracanthonchus macrodon*, В – *Halichoanolaimus sonorus*, Г – *Steineridora borealis*.

Fb – фиброзные тела; fp – филоподии; LP – ламеллиподии; mc – митохондрии; mi – впячивания мембраны; ms – мембранные включения; N – ядро.

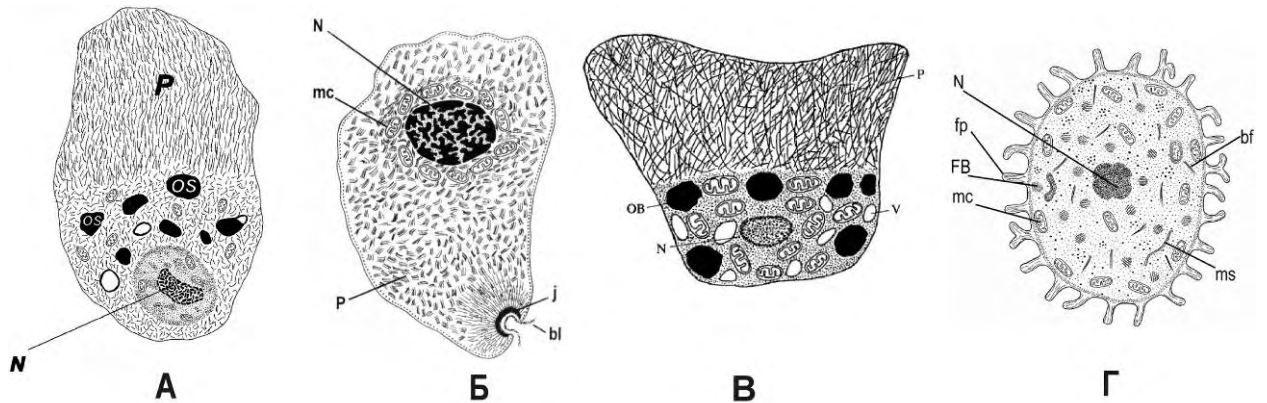


Рис. 7. Схема зрелых сперматозоидов хромадорид. А – *Paracyatholaimus pugettensis*, Б – *Paracanthonchus macrodon*, В – *Neochromadora poecilosoma*, Г – *Halichoanolaimus sonorus*. bf – пучки филаментов; bl – базальная мембрана; FB – фиброзные тела; fp – филоподии; j – контакт со стенкой матки; mc – митохондрии; ms – мембранные включения; N – ядро; OB, OS – осмиофильные включения; P – псевдоподия.

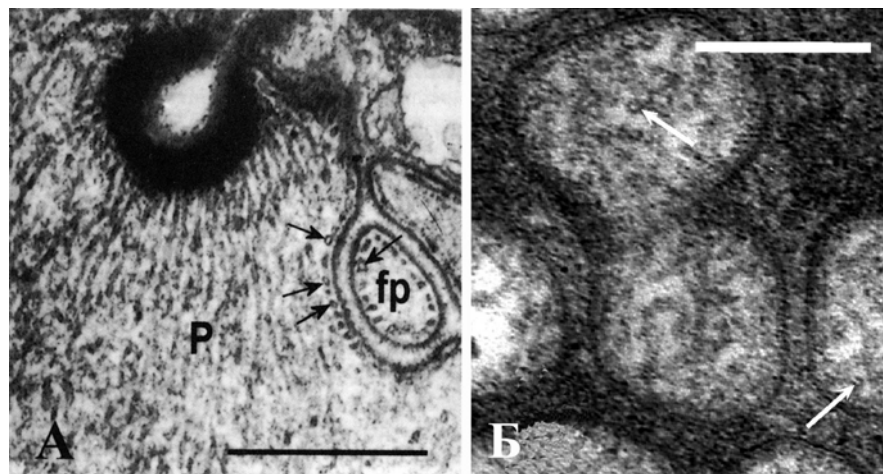


Рис. 8. Микротрубочкоподобные волокна в спермиях хромадорид. А – Соединение зрелого спермия со стенкой матки *Paracanthonchus macrodon*, Б – Поперечный срез через филоподии незрелых спермиев *Halichoanolaimus sonorus*.

Фр – филоподии; P – псевдоподия; стрелками отмечены микротрубочкоподобные волокна. Масштаб: А – 0.5 мкм, Б – 0.2 мкм.

### Семейство *Selachinematidae*

*Halichoanolaimus sonorus*. Сперматоциты (Рис. 4А) заполняющие проксимальную часть семенника, это полигональные клетки с высокой метаболической активностью. Их ядра крупные и содержат ядрышки. Вся цитоплазма клеток заполнена многочисленными митохондриями, рибосомами, цистернами аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулюма.

Сперматиды состоят из округлого ГТК и резидуального тела. В центральной части ГТК располагается ядро, лишенное ядерной оболочки. Ядро окружено электронопрозрачной цитоплазмой, содержащей диспергированный волокнистый материал, а на периферии ГТК сперматиды располагаются крупные митохондрии. Эктоплазма ГТК сперматиды укреплена микротрубочкоподобными волокнами и формирует филоподии. Только в сперматиде обнаруживаются первые предшественники ФТ. Они имеют вид небольших пучков филаментов, разбросанных между митохондриями. ГТК соединено с резидуальным телом широким цитоплазматическим мостиком. Цитоплазма резидуального тела заполнена рибосомами, цистернами шероховатого эндоплазматического ретикулюма и аппарата Гольджи, пузырьками и липидными каплями.

В цитоплазме незрелых спермиев *H. sonorus* (Рис. 6В) располагается ядро, лишенное ядерной оболочки, митохондрии и многочисленные мелкие фиброзные тела. Поверхность клеток формирует филоподии, а цитоплазма заполнена микротрубочкоподобными волокнами 16 нм в диаметре (Рис. 8Б).

В случае *H. sonorus* (Рис. 7В) характерная для нематод активация спермиев в половых протоках самок, по-видимому, отсутствует. Спермии из матки самки напоминают таковые из семенников. Ядро их лишено ядерной оболочки, цитоплазма заполнена митохондриями, ФТ и микротрубочкоподобными волокнами, а поверхность сперматозоидов формирует филоподии. МО или сходные с ними структуры не были обнаружены ни на одной стадии сперматогенеза *H. sonorus*.

### Семейство *Chromadoridae*

*Neochromadora poecilosoma*. Сперматоциты (Рис.4Б) – полигональные клетки, в цитоплазме которых хорошо развит синтетический аппарат в виде многочисленных рибосом, цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулюма и аппарата Гольджи, а также обнаруживаются многочисленные митохондрии. Ядро сперматоцитов крупное, гладкая ядерная оболочка пронизана многочисленными порами, в нуклеоплазме

развивается очень крупное центральное ядрышко. В цитоплазме так же располагаются сгустки плотного волокнистого материала – предшественники ФТ.

Тело сперматид сегрегированно на ГТК и резидуальное тело (Рис. 5Б). В центре главного тела клетки располагается ядро, не окруженное ядерной оболочкой. Цитоплазма ГТК содержит множество митохондрий, а ФТ, состоящие из волокнистого материала, заполняют почти все пространство ГТК. Плазмалемма ГТК формирует многочисленные узкие впячивания. В резидуальных телах конденсируется весь синтетический аппарат клетки – рибосомы, цистерны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи.

Незрелые спермии *N. poecilosoma* сходны по своему строению с ГТК сперматиды. Центральное расположенное ядро лишено ядерной оболочки и окружено митохондриями и ФТ. Плазмалемма спермиев образует глубокие впячивания.

Активированные спермии из самок *N. poecilosoma* (Рис. 7Г) – амебоидные клетки с передней псевдоподией и задним ГТК. Последнее содержит ядро, митохондрии и включения, тогда как псевдоподия заполнена элементами цитоскелета. МО в спермиях *N. poecilosoma* и предшествующих им стадиях обнаружены не были.

***Steineridora borealis***. Сперматоциты (Рис. 4В) – это полигональные клетки. Ядро окружено ядерной оболочкой, пронизанной многочисленными порами. Цитоплазма заполнена многочисленными рибосомами, цистернами эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, митохондриями, осмиофильными включениями и липидными пузырьками. В поздних сперматоцитах *S. borealis* появляются участки активной миелоноподобной цитоплазмы, окруженной цистернами аппарата Гольджи.

У *S. borealis* крупные резидуальные тела объединяет множество ГТК сперматид, соединяющихся с резидуальным телом посредством цитоплазматических мостиков. ГТК имеет коническую форму, в центре его располагается коническое ядро, лишённое ядерной оболочки. Плазмалемма ГТК формирует многочисленные глубокие и узкие впячивания, которые по мере развития обособляются и теряют связь с окружающей средой, превращаясь в цистерны, располагающимися правильными рядами вдоль ядра. Единственное ФТ располагается у расширенной части конусовидного ядра и окружено митохондриями.

Вытянутые полярные незрелые спермии *S. borealis* (Рис. 6Г) отличаются наличием одного крупного ФТ, расположенного под конусовидным ядром, лишенным ядерной оболочки. Вокруг ФТ располагаются митохондрии, чашевидные впячивания наружной мембраны окончательно теряют связь с окружающей средой, а цитоплазма спермиев заполнена микротрубочкоподобными волокнами 18 нм в диаметре.

## Обсуждение

**Зачаток половой системы.** Развитие гонад у *H. sonorus* проходит «стандартную» для нематод четырехклеточную стадию с двумя ППК и двумя соматическими клетками, что подчеркивает большую детерминированность эмбриогенеза нематод. По аналогии с другими нематодами, мы можем предположить, что описанные нами у *H. sonorus* клетки зачатка дают начало всем сперматогенным клеткам (клетки  $Z_2$  и  $Z_3$ ) и эпителиальной выстилке гонады взрослого животного (клетки  $Z_1$  и  $Z_4$ ). Соматические клетки зачатка являются также предшественниками концевых клеток, участвующих в регуляции мейотических делений и обеспечивающих предварительную пролиферацию гониев.

У *H. sonorus* в ППК отсутствуют типичные маркеры половой линии – Р-гранулы, описанные у *C. elegans* и других рабдитий. В то же время у *H. sonorus* в ППК нами была обнаружена электроноплотная диффузная субстанция в виде многочисленных частиц разного размера, не окруженных мембраной, плотно прилегающих к ядерной оболочке. Эти частицы можно ассоциировать с половыми детерминантами, описанными у большинства многоклеточных животных (Eddy, 1975; Айзенштадт, 1984; Reunov *et al.*, 2000). Таким образом, морфологически выраженные детерминанты у хромадорид все же обнаруживаются, но не имеют столь выраженного характера, как у рабдитид.

## Мужская половая система

Концевые клетки хромадорид являются типичными для нематод в целом, они характеризуются наличием крупного ядра, лишённого ядрышка, и хорошо развитым синтетическим аппаратом. В экспериментах на *Caenorhabditis elegans* (Hansen, Pilgrim, 1999) было показано, что концевые клетки поддерживают герминативные клетки дистального конца гонады (гониев) в цикле митотических делений, тормозя их переход к мейозу и дифференциации в гаметы. Электронно-микроскопическим методом невозможно установить функцию дистальных концевых клеток *Paracyatholaimus pugettensis* и *Panduripharynx unidentatus*, и дополнительные исследования в этой области с применением иммуноцитохимических, молекулярно-биологических и биохимических методов могут выявить новые интересные данные.

Клетки стенки семенника *Paracyatholaimus pugettensis*, отростки которых проникают между сперматоцитами, ранее были описаны для *C. elegans*. Было показано, что это эпителиальные клетки, проявляющие синтетическую активность и принимающие участие в регуляции митоза развивающихся половых клеток (Hubbard, Greenstein, 2000). Проводя



аналогию, можно предположить, что клетки стенки дистальной части семенника *Paracyatholaimus pugettensis*, цитоплазма которых несет в себе хорошо развитый синтетический аппарат, а их отростки глубоко проникают между развивающимися сперматоцитами, также принимают участие в регуляции клеточных делений.

В зоне развития поздних сперматоцитов и сперматид эпителий семенника представлен либо сильно уплощенными клетками (*Paracanthochus macrodon*, *N. poecilosoma*), либо вовсе редуцирован до тонкого слоя цитоплазмы и базальной мембраны (*H. sonorus*). Как было экспериментально показано на *C. elegans*, такое строение стенки семенника облегчает транспорт питательных веществ, необходимых для растущих половых клеток (Justine, 2002).

Во всех изученных случаях семенной пузырек нематод-хромадорид сформирован крупными клетками, проявляющими признаки синтетической активности. Подобное строение семенного пузырька было ранее описано для ряда нематод (Богоявленский и др., 1982; Hope, 1974; Hess, Poinar, 1986). Семенной пузырек всегда функционирует как резервуар для хранения спермиев, а в отдельных случаях (как у *H. sonorus*) выполняет так же резорбционную и эякуляторные функции.

Семявыносящий проток у изученных нематод-хромадорид однообразен по строению. Двурядный проток лишен просвета и сужается по мере продвижения от семенника к клоаке. Отсутствие просвета в семявыносящем протоке нематод показано не только для хромадорид, а так же для множества изученных к настоящему времени нематод (Филиппев, 1921; Chitwood, Chitwood, 1950; Hope, 1974; Bird, Bird, 1991; Justine, 2002). Вероятно, клетки протока, плотно прилегающие друг другу большую часть жизни животного, могут раздвигаться во время копуляции, давая дорогу незрелым сперматозоидам, а V-образная мускулатура создает перистальтику, способствующую выбросу сперматозоидов в половую систему самки во время копуляции.

Мужская половая система свободноживущих морских нематод впервые реконструирована нами на ультраструктурном уровне, поэтому было бы уместно в заключение кратко охарактеризовать мужскую половую систему некоторых групп беспозвоночных, которых относят к сборной группе классов – первичнополостным червям или Aschelminthes (*Gnathostomulida*, *Gastrotricha*, *Nematomorpha*, *Rotifera*, *Loricifera*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*). Во многих случаях первичнополостные черви имеют условия обитания (интерстициаль) и биологию размножения, сходные с таковыми свободноживущих морских нематод.

В целом, половая система всех первичнополостных червей устроена однообразно и довольно просто. Во всех случаях она состоит из семенника – эпителиального мешка или трубки с половыми продуктами, и семявыносящих путей. Чаще всего семенники парные,

однако, редукция одного из семенников в равной степени известна во всех группах асгельминтов. Семенник всех первичнополостных червей отграничен от первичной полости тела непрерывной эпителиальной выстилкой. Эпителий семенника у интерстициальных животных, имеющих микроскопические размеры (*Gnathostomulida*, *Gastrotricha*, *Ritifera*, *Loricifera*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Nematoda*), обычно уплощен или даже редуцирован до базальной мембраны.

Семявыносящие протоки асгельминтов образованы эпителиальными клетками и могут подразделяться на морфологические выраженные отделы. У большинства первичнополостных червей каждый семенник снабжен собственным семявыносящим протоком (*Gnathostomulida*, *Gastrotricha*, *Nematomorpha*, *Rotifera*, *Loricifera*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*). У нематод с парными мужскими гонадами семенные пузырьки (проксимальная часть семенников) объединены единственным семяпроводом, по которому половые продукты поступают в клоаку во время копуляции (Chitwood, Chitwood, 1950; Норе, 1974).

У *Gnathostomulida*, *Gastrotricha*, *Ritifera*, *Loricifera*, *Priapulida* и *Kinorhyncha* каждый эякуляторный канал сообщается с внешней средой посредством собственного полового отверстия в стенке тела. Только у нематод и волосатиков эякуляторный канал ведет в клоаку – место соединения кишки и полового протока в общую трубку.

**Сперматозоиды.** В целом, сперматогенез и строение спермиев свободноживущих морских нематод из отряда *Chromadorida* являются типичными для нематод.

Отличительной особенностью хромадорид является полное отсутствие на всех стадиях сперматогенеза обычных для нематод аберрантных органелл – МО, а так же комплексов, формируемых последними с ФТ. ФТ, хотя и формируются у некоторых представителей отряда, лишены типичной паракристаллической структуры, описанной для множества других нематод (Justine, 2002).

«Классическая» для нематод поляризованность (т.е. подразделение на главное тело клетки и псевдоподию) активированных спермиев аскариды и *C. elegans* характерна почти для всех изученных *Rhabditia* и *Euploia*. В то же время, наблюдения, основанные на результатах, полученных с помощью световой микроскопии, показывали, что у хромадорид поляризованность спермиев не выражена (Chitwood, Chitwood, 1977; Riemann, 1983). Исследования с помощью электронной микроскопии показали, что среди изученных к настоящему времени хромадорид, только у представителей рода *Halichoanolaimus* семейства *Selachinematidae* не отмечается поляризации спермиев, находящихся в половых путях самок, что можно даже рассматривать в качестве признака, характерного для этих

нематод. У всех остальных изученных к настоящему времени хромадорид спермии поляризованные.

После мейоза ядерная оболочка у хромадорид, как и у большинства нематод, за исключением эноплид, не восстанавливается. Хроматин ядра конденсируется не полностью и может состоять из мелких частиц. Такое строения ядерного хроматина известно для паразитических нематод из отрядов Dorylaimida и Tylenchida.

Центриоли, обнаруженные нами у *Paracyatholaimus pugettensis*, устроены типичным для нематод образом и состоят из девяти синглетов, что может быть характерным для отряда в целом.

Большинство спермиев нематод имеют многочисленные митохондрии обычного для соматических клеток строения (Justine, Jamieson, 1999; Justine, 2002). У изученных нами хромадорид митохондрии также многочисленны, они сохраняются в течение всего цикла сперматогенеза, однако их число в спермиях всегда резко снижается.

Обычно в поляризованных спермиях нематод митохондрии располагаются на границе псевдоподии и ГТК, что отражает их функцию, связанную с энергетическим обеспечением амебоидного движения клетки (McLaren; 1973; Burghard, Foor, 1975; Justine, 2002 и др.). В биполярных спермиях хромадорид (н-р, *N. poecilosoma*) также наблюдалась характерная концентрация спермиев в основании псевдоподии. При этом в сперматозоидах с невыраженной поляризацией (н-р, *H. sonorus*) митохондрии распределяются равномерно, не формируя кластеров.

Аберрантные органеллы (мембранные органеллы и фиброзные тела) к настоящему времени обнаружены у многих рабдитий в виде МО-ФТ-комплексов, а так же изучены основные аспекты биологии этих комплексов и их компонентов. У тиленхид, хромадорид и десмодорид на всех стадиях сперматогенеза отсутствуют мембранные органеллы, но у большинства из них все же развиваются типичные или модифицированные фиброзные тела. У хромадорид *Paracanthonchus macrodon*, *Euchromadora robusta* и *Panduripharynx unidentatus* ни на одной стадии развития спермиев не формируются фиброзные тела, хотя сперматогенез проходит по обычному пути, а активированные спермии имеют типичное строение и состоят из псевдоподии и главного тела клетки. Таким образом, можно говорить о том, что у некоторых нематод-хромадорид накопление материала, необходимого для формирования цитоскелета псевдоподии, происходит без образования ФТ.

В сперматогенных клетках хромадорид на ультраструктурном уровне выявляются оригинальные элементы цитоскелета, названные нами микротрубочкоподобные волокна (МПВ). МПВ заполняют весь объем цитоплазмы, формируют слой под наружной мембраной клетки, включая филоподии, в которых они ориентированы вдоль продольной

оси филоподий. Ранее эти структуры ошибочно принимали за микротрубочки, однако диаметр МПВ у изученных нами хроматорид значительно меньше, чем у микротрубочек и никогда не превышает 20 нм. Кроме того, в спермиях нематод тубулин, и, соответственно, микротрубочки, отсутствуют (Justine, 2002). Таким образом, основой МПВ должен быть MSP, который не только составляет белковую основу сперматозоидов, но и имеет примечательную способность к формированию трубчатых структур (Justine, 2002).

Можно выделить два паттерна развития спермиев у хроматорид, причем для обоих характерно отсутствие МО на всех стадиях сперматогенеза.

1. Развитие с формированием фиброзных тел (Юшин, Зограф, 2002; Yushin, 2003b; Зограф, Юшин, 2004; Zograf *et al.*, 2004; данная работа);

2. Развитие без aberrantных органелл, кроме МО отсутствуют и ФТ (Yushin, Coomans, 2000; Yushin, Zograf, 2004).

У представителей отряда *Desmodorida*, который рассматривается как филогенетически наиболее близкий к хроматоридам, недавно также обнаружены два паттерна развития сперматозоидов (развитие только с ФТ и развитие без aberrantных органелл), характерные для хроматорид (Yushin, Coomans, 2005; Zograf *et al.*, 2006). Это сходство сперматозоидов подтверждает последние данные молекулярной филогении, по которым хроматориды и десмодориды объединяются в кладу близкородственных отрядов (De Ley, Blaxter, 2002; Holterman *et al.*, 2006).

Редукция МО с сохранением ФТ известна так же для представителей отряда *Tylenchida* (Shepherd, Clark, 1983; Endo *et al.*, 1998). К настоящему времени накоплены многочисленные морфологические, эмбриологические и молекулярно-генетические данные, подтверждающие филогенетическую близость подклассов нематод *Chromadoria* и *Rhabditia* (Malakhov, 1994; De Ley, Blaxter, 2002), к которым соответственно относятся хроматориды и тиленхиды. На основе сходства эмбриогенеза высказывается так же мнение и об относительной филогенетической близости отрядов *Tylenchida* и *Chromadorida* (Дроздовский, 1989). Сходство цитодифференциации мужских гамет тиленхид и хроматорид может быть использовано в качестве дополнительного аргумента, подтверждающего данную точку зрения.

## Выводы

1. Половой зачаток у личинки первой стадии свободноживущей морской нематоды-хромадорида *Halichoanolaimus sonorus*, представителя подкласса Chromadoria, состоит из двух первичных половых клеток (ППК) и двух соматических клеток. ППК *H. sonorus* лишены типичных для нематод-рабдитий крупных Р-гранул, в качестве половых детерминант могут рассматриваться приядерные частицы электроноплотной диффузной субстанции.

2. Эпителий семенников свободноживущих морских нематод-хромадорид имеет крупную дистальную концевую клетку, подобную таковым у нематод подкласса Rhabditia. В зоне сперматоцитов и сперматид эпителий редуцируется до тонкой цитоплазматической пленки и базальной мембраны, что, по-видимому, облегчает питание развивающихся половых продуктов из полости тела. Семенной пузырек сформирован железистыми клетками, которые проявляют секреторную и абсорбционную активность, обеспечивающую утилизацию резидуальных тел и абортивных половых клеток.

3. Семявыносящий проток нематод-хромадорид устроен однообразно, он состоит из двух рядов крупных железистых клеток, между которыми нет постоянного просвета. Проток в проксимальной части трансформируется в короткий окруженный мышцами семяизвергательный канал, впадающий в клоаку вместе с четырьмя крупными клетками железистой природы (простатическими железами).

4. Сперматозоиды нематод-хромадорид – амебоидные клетки, лишённые аксонемы, акросомы и ядерной оболочки. Зрелые спермии у всех изученных видов, за исключением представителей семейства Selachinematidae, это биполярные амебоидные клетки с передней псевдоподией и задним главным телом клетки. В последнем расположено ядро, рядом с которым обнаруживаются центриоли  $9 \times 1$ , и митохондрии. Отличительной особенностью хромадорид является полное отсутствие аберрантных мембранных органелл (МО) на всех стадиях сперматогенеза, а фиброзные тела (ФТ), если развиваются, лишены типичной паракристаллической структуры.

5. В спермиях нематод-хромадорид и, по-видимому других нематод, присутствует уникальный компонент цитоскелета – микротрубочкоподобные волокна (МПВ), сформированные, предположительно, на основе белка MSP (major sperm protein), характерного исключительно для сперматозоидов нематод. МПВ способны участвовать в формировании клеточных контактов, морфологически сходных с гемидесмосомами.

6. Описано два паттерна строения и развития спермиев нематод-хромадорид: (1) спермии, в которых формируются только ФТ, а МО отсутствуют; (2) спермии с полной

редукцией aberrantных органелл. Подобные два паттерна, которые можно расценивать как редуцированные (по сравнению с другими) нематодами, известны также для нематод-десмодорид (*Desmodorida*), филогенетически близких к хромадоридам.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зограф Ю.К., Юшин В.В. Электронно-микроскопическое исследование сперматогенеза у свободноживущей морской нематоды *Neochromadora poecilosoma* (*Chromadorida*, *Chromadoridae*) // II Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии: Тез. докл. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1999. С. 59–60.
2. Зограф Ю.К. Электронно-микроскопическое исследование спермиев свободноживущей морской нематоды *Paracanthonchus macrodon* (*Cyatholaimidae*, *Cyatholaimina*) // IV Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии: Тез. докл. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2001. С. 50–51.
3. Зограф Ю.К., Юшин В.В. Ультраструктура спермиев у свободноживущих морских нематод из отряда *Chromadorida* (*Chromadoria*) // Фундаментальные исследования морской биоты: Биология, биохимия и биотехнология, Владивосток, 1–2 окт. 2002 г.: Мат. конф. НОЦ ДВГУ "Морская биота". – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2002. С. 51–52.
4. Юшин В.В., Зограф Ю.К. Электронно-микроскопическое исследование сперматогенеза у свободноживущей морской нематоды *Neochromadora poecilosoma* (*Chromadorida*, *Chromadoridae*) // Биол. моря. 2002. Т. 28, № 1. С. 47–52.
5. Zograf J.K., Yushin V.V. Ultrastructural study of sperm development in the free-living marine nematode *Halichoanolaimus sonorus* (*Chromadorida*, *Selachinematidae*) // Russ. J. Nematol. 2003. Vol. 11, No. 2. P. 152. [Abstract].
6. Zograf J.K., Yushin V.V. Electron microscopic study of the spermatogenesis in free-living marine nematode *Paracyatholaimus pugettensis* (*Chromadorida*, *Cyatholaimidae*) // Russ. J. Nematol. 2003. Vol. 11, No. 2. P. 152–153. [Abstract].
7. Zograf J.K., Yushin V.V. Ultrastructure of spermatozoa in the free-living marine nematode *Paracanthonchus macrodon* (*Nematoda*, *Chromadorida*) // Russ. J. Nematol. 2003. Vol. 11, No. 2. P. 153. [Abstract].
8. Zograf J.K., Yushin V.V., Malakhov V.V. Ultrastructure of spermatogenesis in the free-living marine nematode *Halichoanolaimus sonorus* (*Chromadorida*: *Selachinematidae*) // Nematology. 2004. Vol. 6, No. 6. P. 797–809.

9. Зограф Ю.К., Юшин В.В. Электронно-микроскопическое исследование сперматогенеза у свободноживущей морской нематоды *Paracyatholaimus pugettensis* Wieser et Hopper, 1967 (Chromadorida, Cyatholaimidae) // Биол. моря. 2004. Т. 30, № 6. С. 455–461.
10. Yushin V.V., Zograf J.K. Ultrastructure of spermatozoa in the free-living marine nematode *Paracanthonchus macrodon* (Nematoda, Chromadorida) // Invertebr. Reprod. Develop. 2004. Vol. 45, № 1. P. 59–67.
11. Zograf J.K. The ultrastructure of the male reproductive system of *Paracyatholaimus pugettensis* (Nematoda, Chromadorida) // Russ. J. Nematol. 2005. Vol. 13, № 2. P. 165. [Abstract].
12. Zograf J.K., Bert W. The structure of the female reproductive system of the entomopathogenic nematodes from genus *Steinernema* (Steinernematidae) // XXVIII International Symposium of the European Society of Nematologists, Blagoevgrad, Bulgaria, 5–9 June 2006. Programme and Abstracts. Sofia–Moscow, Pentsoft, 2006. P. 85.
13. Zograf J.K., Kravchenko A.A., Yushin V.V. The ultrastructure of the male reproductive system and spermatozoa of the free-living marine nematode *Monoposthia costata* (Chromadorida, Desmodorida) // XXVIII International Symposium of the European Society of Nematologists, Blagoevgrad, Bulgaria, 5–9 June 2006. Programme and Abstracts. Sofia–Moscow, Pentsoft, 2006. P. 89.
14. Afanasiev-Grigoriev A.G., Zograf J. K., Yushin V.V. Nuclear envelope in the spermatozoa of the leptosomatid nematode *Leptosomatides marinae* (Enoplida, Leptosomatidae) // Russian Journal of Nematology. 2006. Vol. 14. № 1. P. 119–125.

**Юлия Константиновна ЗОГРАФ**

**УЛЬТРАСТРУКТУРА МУЖСКОЙ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ  
И СПЕРМАТОЗОИДОВ У СВОБОДНОЖИВУЩИХ МОРСКИХ НЕМАТОД  
ИЗ ОТРЯДА CHROMADORIDA**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук