

На правах рукописи

Винникова Виктория Владимировна

**УЛЬТРАСТРУКТУРА И МОРФОГЕНЕЗ СКЕЛЕТА ИГЛ
МОРСКИХ ЕЖЕЙ**

03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор Дроздов Анатолий Леонидович
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор Долматов Игорь Юрьевич доктор биологических наук Миронов Александр Николаевич
Ведущая организация:	Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН

Защита состоится 1 июля 2011 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: 7 (4232) 31-09-05, факс 7 (4232) 31-09-00.
e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан 31 мая 2011 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Морфологическое многообразие является отражением закономерного развития системы признаков разного уровня сложности, последовательно или параллельно развивающихся в онтогенезе. Одни системы признаков образуют общий план строения, другие – его более частные особенности, поддерживая, таким образом, стройную иерархию таксонов (Рожнов, 2006). При установлении систем признаков важно учитывать внутригрупповое многообразие способов их формообразования. Картины, составляемые из формообразовательных актов, имеют значение как для расшифровки филогенезов (установления филогенетической преемственности, родства), так и для выяснения закономерностей формообразования (Мамкаев, 2004).

Морфогенетические изменения в процессе исторического развития класса морских ежей естественным образом затрагивают структуры самого разного уровня организации, образуя в каждой группе морских ежей характерную совокупность морфологических признаков. Среди этой совокупности, большое внимание уделяется организации скелетных структур морских ежей, в частности игл. Благодаря способности длительное время сохраняться в геологических отложениях, эти образования можно эффективно использовать в стратиграфической науке. Однако, в связи с отсутствием разработанной теории, объясняющей становление скелета игл в разных отрядах морских ежей, это до сих пор не представлялось возможным. С одной стороны, структура иглы отражает эволюционную принадлежность морского ежа к определенному отряду. С другой – вариации общего плана строения данной структуры в пределах одного семейства или рода, позволяют рассматривать структуру иглы в качестве родо- и видоспецифичного признака. Интерес к изучению игл морских ежей в последнее десятилетие особенно усилился в связи с обнаружением ультраструктурных различий в иглах криптических видов морских ежей. Например, в роде *Echinometra* некоторые виды различаются между собой только ультраструктурой спермиев и игл (Palumbi, Metz, 1991; Palumbi et al., 1997). Кроме того, различия в окраске и длине игл у двух экоморфологических форм *Strongylocentrotus intermedius*, наряду с различиями ядерного генома расцениваются некоторыми авторами в качестве морфологического отображения процесса видообразования (Balakirev et al., 2008).

Установление филогенетической преемственности, как и рассмотрение основных механизмов эволюции скелета игл у морских ежей, осложняется изменчивостью их структуры на разных этапах индивидуального развития животного.

До сих пор не было попытки получить общую картину, отображающую формирование всей совокупности различных морфоструктурных паттернов скелета игл морских ежей на разных стадиях онтогенеза. Исторически сложилось, что морфологию игл взрослых морских ежей традиционно используют зоологи–систематики для решения таксономических задач, оставляя без внимания процесс формирования их дефинитивной структуры. Формирование скелета игл, как правило, исследуют эмбриологи, описывая процесс личиночного спикулогенеза, особенно не акцентируя внимание на особенностях их скелетной структуры. Таким образом, исследование способов морфогенеза скелета игл в процессе репаративной регенерации является необходимым условием, способным прояснить значение филэмбриогенетических преобразований для эволюции их структуры.

Кроме того, изучение процесса репаративного морфогенеза скелета дефинитивных игл морских ежей и сравнение рассмотренных процессов с этапами формирования игл в раннем онтогенезе дает возможность проанализировать соотношение между регенерацией и процессами нормального онтогенетического развития скелета игл морских ежей. Как отмечает Карлсон (1986), изучение процессов восстановительного роста удаленных структур на морфологическом уровне будет первым шагом к пониманию того, следует ли рассматривать регенерацию как рекапитуляцию нормального онтогенетического развития или она имеет совершенно иной морфогенетический паттерн развития.

Несмотря на то, что феномен регенерации игл морских ежей впервые обнаружен во второй половине 19 века (Carpenter, 1870), понимание данного процесса до сих пор остается неполным. Немногочисленные работы, рассматривающие особенности регенерации морских ежей, посвящены, как правило, процессам скелетного роста частично поврежденных игл правильных морских ежей, которые характеризуются отсутствием аксиальной полости. (Ebert, 1967; Heatfield, 1971a, b; Shimizu, Yamada, 1980; Dubois, Ameye, 2001). Такие иглы образованы лабиринтовидной сердцевинной и расположенными вокруг нее продольными ребрами (Treatise..., 1966). Как отмечает Хитфилд (Heatfield, 1971a), регенерация частично поврежденной иглы *Strongylocentrotus purpuratus* начинается в области сердцевины. Для игл морских ежей из отряда Diadematoida, характеризующихся наличием свободной от стереома аксиальной полости, репарация поврежденной иглы начинается в области перфорированного кальцита, который разграничивает аксиальную полость от продольных ребер иглы (Mischor, 1975). Однако полностью отсутствуют данные по восстановлению частично поврежденных игл неправильных морских ежей, интерес к которым усиливается в связи с наличием у них

большого количества морфофункциональных типов. Например, у плоских морских ежей различают миллиарные, булавовидные, локомоторные и амбитальные иглы (Eilers, Telford, 1984). Сердцевидные морские ежи насчитывают около 20 типов игл (Smith, 1980). Структура этих игл отличается от вышеописанных игл камародонтного и диадематоидного типов отсутствием как лабиринтовидного стереома, так и отчетливого промежуточного слоя перфорированного кальцита (Mortensen, 1948a, b; 1950).

Кроме того, полностью отсутствуют сведения о процессах репаративного роста иглы после полного ее удаления с поверхности панциря.

Таким образом, исследование структурных превращений, сопровождающих формирование скелета игл морских ежей на разных стадиях онтогенеза, способствуют пониманию филогенеза и закономерностей эволюции формообразующих механизмов у морских ежей.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы является сравнительное изучение морфогенезов скелета игл морских ежей.

Исходя из этого, задачи были следующими:

1. Исследовать ультраструктуру скелета игл морских ежей из отрядов Cidaroida, Echinothurioida, Diadematoida, Arbacioida, Pedinoida, Temnopleuroida, Clypeasteroida, Spatangoida и Camarodonta; проанализировать полученные данные с точки зрения сравнительной морфологии и филогении класса Echinoidea.

2. Изучить процесс репаративного морфогенеза скелета полностью удаленных и частично поврежденных дефинитивных игл морских ежей из отрядов Camarodonta, Clypeasteroida и Spatangoida; выявить общие закономерности формирования скелета иглы на разных стадиях онтогенеза морских ежей.

3. Исследовать ультраструктуру женских и мужских гамет морских ежей с точки зрения представлений о репродуктивной изоляции как об основном механизме видообразования; сравнить полученные данные с особенностями ультраструктурной организации игл сердцевидного морского ежа *Echinocardium cordatum*, характеризующегося географически разорванным ареалом.

Научная новизна. Впервые представлены данные по ультраструктуре скелета игл 22 видов морских ежей. Впервые показано, что сохранение аксиальной полости в иглах морских ежей на протяжении всего онтогенеза является апоморфным состоянием, а присутствие в онтогенезе Camarodonta ювенильных игл с аксиальной полостью и дефинитивных игл без нее является плезиоморфным состоянием. Впервые исследован репаративный морфогенез скелета полностью удаленных игл, а также скелета частично

поврежденных игл морских ежей из отрядов Clypeasteroidea и Spatangoida. Показано, что репаративный морфогенез скелета полностью удаленных и частично поврежденных игл морских ежей из этих отрядов, а также полностью удаленных игл морских ежей из отряда Camarodonta приводит к полному восстановлению исходной структуры. Однако, при регенерации частично поврежденных игл Camarodonta происходит запаздывание и последующая остановка латерального роста, в результате чего наблюдается недоразвитие стержня по толщине.

На основе сравнительного анализа процессов морфогенеза дефинитивных игл на разных стадиях онтогенеза впервые высказана гипотеза педоморфного происхождения игл неправильных морских ежей Clypeasteroidea и Spatangoida в результате сохранения во взрослом состоянии ювенильной стадии дефинитивной иглы правильных морских ежей.

Впервые проанализирована ультраструктура спермиев у 4 видов и яйцевых оболочек у 7 видов морских ежей. Впервые на основе ультраструктуры спермиев и игл выявлена пара криптических видов *Echinocardium* ex gr. *cordatum*: *Echinocardium cordatum* s. str. (Средиземное море) и *Echinocardium* sp. (Японское море).

Личный вклад. Материал, положенный в основу диссертационной работы получен, обработан и проанализирован автором самостоятельно.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты ультраструктурного исследования скелета игл морских ежей, а также процессов их формирования на морфологическом уровне послужат основой для дальнейших исследований цитологических и биохимических механизмов морфогенеза клеточных и внеклеточных структур. Полученные оригинальные данные могут быть использованы в систематике морских ежей и положены в основу идентификации криптических видов. Представленные в диссертации данные, касающиеся роста и формирования структуры игл различных групп морских ежей, могут послужить удобной моделью для тестирования медицинских препаратов и воздействий различной природы. Результаты работы могут быть включены в программы общих и специализированных курсов по биологии развития и зоологии для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

Апробация результатов работы. Материалы диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: Конференция студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ «Фундаментальные исследования морской биоты: биология, биохимия и биотехнология» (Владивосток, 2006); XII и XIII Всероссийских молодежных школах–конференциях по актуальным проблемам химии и

биологии (МЭС ТИБОХ, Владивосток, 2009, 2010); IX региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии (Владивосток, 2010); I международной школе-конференции по эмбриологии морских беспозвоночных «International course in embryology of marine invertebrates» (ББС МГУ, Москва, 2010); Всероссийской конференции по иглокожим (Москва, 2011); ежегодных отчетных конференциях и на семинарах лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 158 публикаций. Работа изложена на 116 страницах, содержит 3 таблицы, 31 рисунок.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010.

Благодарности. Автор искренне благодарит научного руководителя А.Л. Дроздова за всестороннюю помощь и поддержку; А.В. Чернышева за полезное обсуждение и помощь в осмыслении результатов работы; В.В. Юшина, И.Ю. Долматова и К.А. Винникова за критический анализ работы и полезные рекомендации. С.А. Тюрина, О.А. Юрченко за ценные рекомендации касательно методической части работы; А.Н. Миронова и А.В. Смирнова за предоставленную возможность работы с коллекциями морских ежей Зоологического института РАН (С.-Петербург) и Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН (Москва). Кроме того, автор выражает искреннюю признательность всему коллективу Лаборатории эмбриологии, а также сотрудникам Дальневосточного центра электронной микроскопии при Учреждении Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе обобщены литературные сведения по морфологии и процессах формирования скелета игл морских ежей, а также представлены данные по ультраструктуре гамет морских ежей, обеспечивающих существование репродуктивного барьера между видами.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящей работе используется система крупных таксонов класса морских ежей, разработанная Кро и Смитом (Kroh, Smith, 2010). Выделение *Strongylocentrotus nudus* в самостоятельный род *Mesocentrotus* принимается нами вслед за Татаренко, Полтараус (1993).

Ультраструктура игл изучена у 22 видов морских ежей: *Cidaris cidaris*, *Stereocidaris hawaiiensis* (отр. Cidaroida, сем. Cidaridae), *Araeosoma fenestratum* (отр. Echinothurioidea, сем. Echinothuriidae), *Centrostephanus longispinus* (отр. Diadematoidea, сем. Diadematidae), *Coelopleurus floridanus* (отр. Arbacioidea, сем. Arbaciidae), *Salenia profundi* (отр. Salenoida, сем. Saleniidae), *Caenopedina* sp. (отр. Pedinoida), *Strongylocentrotus intermedius*, *S. droebachiensis*, *S. pallidus*, *S. polyacanthus*, *Mesocentrotus nudus*, *M. franciscanus* и *Allocentrotus fragilis* (отр. Camarodonta, сем. Strongylocentrotidae), неизвестный представитель из отр. Cassiduloida; *Scaphechinus mirabilis*, *S. griseus* (отр. Clypeasteroida, сем. Scutellidae), *Echinarachnius parma* (отр. Clypeasteroida, сем. Echinarachniidae), *Echinocardium cordatum* (25 особей) и *Echinocardium mediterraneum* (10 особей) (отр. Spatangoidae, сем. Loveniidae), *Pourtalesia* sp. (отр. Holasteroida, сем. Pourtalesiidae).

В основу изучения морфологии игл был положен материал из коллекций Учреждения Российской академии наук Зоологического института РАН и Института Океанологии им. П.П. Ширшова, сборы E. Egea, A. Chenuil, Centre d'Océanologie de Marseille из акваторий Средиземного моря, а также собственные сборы морских ежей из зал. Восток и Амурского залива Японского моря.

Ультраструктура гамет и репаративный морфогенез частично и полностью удаленных игл исследованы у 6 видов морских ежей: *Strongylocentrotus intermedius* и *Mesocentrotus nudus* (отр. Camarodonta, сем. Strongylocentrotidae); *Scaphechinus mirabilis*, *S. griseus* (отр. Clypeasteroida, сем. Scutellidae), *Echinarachnius parma* (отр. Clypeasteroida, сем. Echinarachniidae) и *Echinocardium* sp. (из Японского моря) (отр. Spatangoida, сем.

Loveniidae). Кроме того была изучена ультраструктура спермиев у *Echinocardium cordatum* s. str. из Средиземного моря (15 особей).

В основу изучения морфологии гамет был положен материал, собранный в зал. Петра Великого (зал. Восток, Амурский залив) Японского моря в июле – августе 2009, 2010 гг., а также сборы E. Egea и A. Chenuil, Centre d'Océanologie de Marseille из акваторий Средиземного моря.

Для просвечивающей электронной микроскопии использовали методы фиксации в глютаральдегиде и тетроксиде осмия в различных буферных смесях и заливки в эпоксидные смолы. Тонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и 7 исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss). Результаты были обработаны при помощи программы Statistica v.6

Для исследования ультраструктуры скелета дефинитивных игл, а также образцов растущих игл морских ежей в процессе репаративной регенерации использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Для этого иглы промывали в проточной воде, высушивали, монтировали на металлические столики и напыляли платиной. Для исследования игл на разных стадиях роста их обрабатывали 20%-ным раствором NaOH. Материал изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа EVO 40 (Carl Zeiss).

Для изучения процесса репаративного морфогенеза игл, особи морских ежей с минимальной размерной вариацией панциря были собраны в Амурском заливе (залив Петра Великого, Японское море) в августе - ноябре 2009, 2010 гг. и помещены в аквариум с проточной морской водой. Отбирали шаровидных морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*, *Mesocentrotus nudus* с диаметром панциря 65 мм, плоских – диаметром 40 мм (*S. griseus*) и 55 мм (*S. mirabilis*, *Echinarachnius parma*) и сердцевидных – длиной 40 мм (*Echinocardium cordatum*). Температура воды в аквариуме составляла 11–15°C. Перед посадкой в аквариум у животных удаляли участок игольного покрова площадью 1 см² или отрезали стержень иглы на расстоянии 5 мм от его основания – у шаровидных и 3 мм – у плоских морских ежей. В качестве корма использовалась *Laminaria japonica*.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Сравнительные аспекты ультраструктуры дефинитивных игл взрослых морских ежей

В настоящей работе приведено описание ультраструктуры дефинитивных игл у 22 видов морских ежей из 9 отрядов.

В результате сравнения структуры дефинитивных игл у высших и низших отрядов филогенетического ствола морских ежей было обнаружено, что распределение признаков структуры игл, происходит в соответствии с концепцией конструктивного, или архаического морфологического многообразия, выдвинутой Ю.В. Мамкаевым (1991). Данная концепция была выявлена при сравнении таксонов по характеру их многообразия и сформулирована следующим образом: «чем ближе таксон к тому эволюционному этапу, на котором сформировалась данная морфофункциональная система, тем больше конструктивное многообразие этой системы в данном таксоне». Первое появление дефинитивных игл с аксиальной полостью в классе морских ежей произошло в отряде Echinothurioida. У дефинитивных игл как оральной, так и аборальной сторон панциря аксиальная полость может быть частично, или целиком заполнена вторичными трабекулами стереома, а может быть свободной от них. Кроме того, в значительной степени варьирует структура кальциевого слоя, несущего продольные ребра различной формы. Различия данного характера носят видовой статус. Например, у оральных игл *Asthenosoma varium* аксиальная полость целиком заполнена рыхлым трабекулярным стереомом, а у *Asthenosoma ijimai*, трабекулярный стереом заполняет меньше половины аксиальной полости (Mortensen, 1935). В отличие от значительных вариаций в строении иглы с аксиальной полостью в базальном отряде Echinothurioida, в отрядах неправильных морских ежей Clypeasteroida, Cassiduloida, Holasteroida и Spatangoida иглы имеют достаточно простое строение. Они образованы продольными ребрами, окружающими аксиальную полость. Видовые различия в структуре данных игл, как правило, обеспечиваются вариациями микроскульптуры продольных ребер. Однако, однообразие в структуре игл компенсируется наличием большого числа их морфофункциональных типов.

Появление игл без аксиальной полости, сердцевина которых заполнена плотным стереомом произошло в древнейшем отряде Cidaroida. В отличие от эволюционно относительно молодых отрядов группы Echinacea (Salenoida, Pedinoida, Temnopleuroidea и Camarodonta), которым также свойственно отсутствие аксиальной полости, в структуре сердцевины, воротничковой зоны и кортекса игл цидароидов наблюдаются значительные вариации. Основываясь на этом факте, было выдвинуто предположение о том, что структура игл у представителей Echinacea первично произошла от цидароидного типа, но постепенно теряла цидароидный характер, переходя в поздние темноплеуроидный и камародонтный типы (Treatise..., 1966). Иглы, обладающие более или менее выраженными цидароидными чертами встречаются у древнейших, наиболее примитивных

отрядов Echinacea таких как Salenoida, Hemicidaroida, у некоторых Phymosomatoida и Arbacioida.

Таким образом, в базальных отрядах морских ежей, таких как Cidaroida, Echinothurioida обнаружено большее разнообразие в структуре скелета игл, чем в отрядах Camarodonta, Clypeasteroida и Spatangoida в соответствии с концепцией конструктивного морфологического разнообразия.

В результате сравнительного изучения ультраструктуры дефинитивных игл морских ежей на разных стадиях онтогенеза было обнаружено, что иглы морских ежей из отрядов Echinothurioida, Diadematoidea, Cassiduloidea, Clypeasteroida, Holasteroida, и Spatangoida сохраняют аксиальную полость на протяжении всего онтогенеза. Дефинитивные иглы морских ежей из древнейшего отряда Cidaroida, а также отрядов Phymosomatoida, Arbacioida, Camarodonta и Salenoida, на ювенильной стадии также имеют аксиальную полость, которая впоследствии исчезает и формируются иглы, заполненные стереомом. Сохранение аксиальной полости в иглах морских ежей на протяжении всего онтогенеза предлагаем считать апоморфным состоянием. Присутствие в онтогенезе морских ежей из отряда Camarodonta ювенильных игл с аксиальной полостью и дефинитивных игл без нее, в свою очередь, предлагаем рассматривать в качестве плезиоморфного состояния, характерного также для класса морских звезд.

Изучение игл морских ежей из семейства Strongylocentrotidae позволило не только подтвердить видоспецифичность рассмотренных ранее на уровне световой микроскопии таких морфологических признаков как форма и микроскульптура наружной поверхности продольных ребер, радиально расходящихся от сердцевины (Бажин, 1995; Бажин, Степанов, 2002), но и обнаружить не менее важные в таксономическом отношении признаки – форму продольных ребер на поперечном спиле, и внешний вид и расположение зубчиков, образующих поперечные ряды. Таким образом, проведенные нами исследования согласуются с данными вышеупомянутых авторов о выделении чёрного и красного морских ежей в новый род *Mesocentrotus* (Татаренко, Полтараус, 1993). Кроме того, представляется, что выделение рода *Allocentrotus* нецелесообразно. Это также подтверждается результатами анализа последовательностей митохондриальной ДНК стронгилоцентротид (Biermann et al., 2003), согласно которому представитель рода *Allocentrotus* – *A. fragilis*, группируется в кластер с представителями рода *Strongylocentrotus*, кроме обособленно стоящих *S. nudus* и *S. franciscanus*, которых целесообразно выделить в род *Mesocentrotus*.

При изучении ультраструктуры 7 типов игл у сердцевидных морских ежей рода *Echinocardium* (*Echinocardium* sp. из Японского моря, *Echinocardium* s. str. *cordatum* из Средиземного моря и *Echinocardium mediterraneum*) обнаружены видовые различия в структуре ребер у апикальных, латеро–вентральных, анальных, субанальных игл и игл пластрона. Наиболее яркие различия наблюдаются в строении апикальных игл. Продольные ребра иглы данного типа у *Echinocardium* s. str. *cordatum* на поперечном спиле отчетливо треугольные, примыкают к кальциевому слою с помощью длинных трабекул. У *Echinocardium* sp. продольные ребра апикальных игл трапециевидной формы. Продольные ребра латеро–вентральных и анальных игл *Echinocardium* sp. на поперечном спиле иглы имеют прямоугольную форму, а у *Echinocardium* s. str. *cordatum* трапециевидную. Кроме того, отличительная черта анальных игл *Echinocardium* sp. заключается в наличии одиночных трабекулярных образований внутри аксиальной полости иглы. Субанальные иглы и иглы пластрона *Echinocardium* sp., напротив, характеризуются трапециевидной формой. На поперечном спиле ребра игл этих двух типов у *Echinocardium* s. str. *cordatum* имеют прямоугольную форму.

Совокупность данных различий строения апикальных, латеро–вентральных, анальных, субанальных игл и игл пластрона предлагаем рассматривать в качестве дополнительного аргумента в пользу существования криптических видов комплекса *Echinocardium cordatum* (Дроздов, Винникова, 2010; Chenuil, Feral, в печати).

3.2. Эволюционные аспекты морфогенеза скелета игл морских ежей

В процессе личиночного спикүлогенеза у морских ежей из отряда Camarodonta формируются ювенильные и дефинитивные иглы, которые характеризуются различной скелетной структурой и расположением на панцире. Ювенильные иглы также называют эмбриональными, дорсальными, тетрадиальными и мультифидными – имеющими несколько отростков на верхушке. Они резорбируются в течение нескольких недель после оседания животного. Дефинитивные иглы обладают одной отчетливой верхушкой. Они состоят из нескольких продольных трабекул, объединенных поперечными перемычками. Принято считать, что дефинитивные иглы растут наряду с пластинками панциря морского ежа, сохраняя свою структуру во взрослом состоянии. Однако, сравнительный анализ дефинитивных игл у взрослых и ювенильных морских ежей данного отряда выявил значительные различия в их структурной организации.

У морских ежей из отрядов Clypeasteroidea и Spatangoida в процессе личиночного спикүлогенеза формируются только дефинитивные иглы двух типов: с замкнутой и

незамкнутой верхушкой, которые отличаются от дефинитивных игл взрослых морских ежей лишь размерами. Их структура соответствует структуре милиарных и локомоторных игл взрослых плоских морских ежей, и игл субанальной фасциолы, локомоторных игл взрослых сердцевидных морских ежей.

Таким образом, дефинитивные иглы ювенильных морских ежей из отряда *Camarodonta* и дефинитивные иглы ювенильных и взрослых морских ежей из отрядов *Clypeasteroida* и *Spatangoida* имеют сходную скелетную структуру. Данное сходство имеет под собой общую морфогенетическую основу (рис.1).

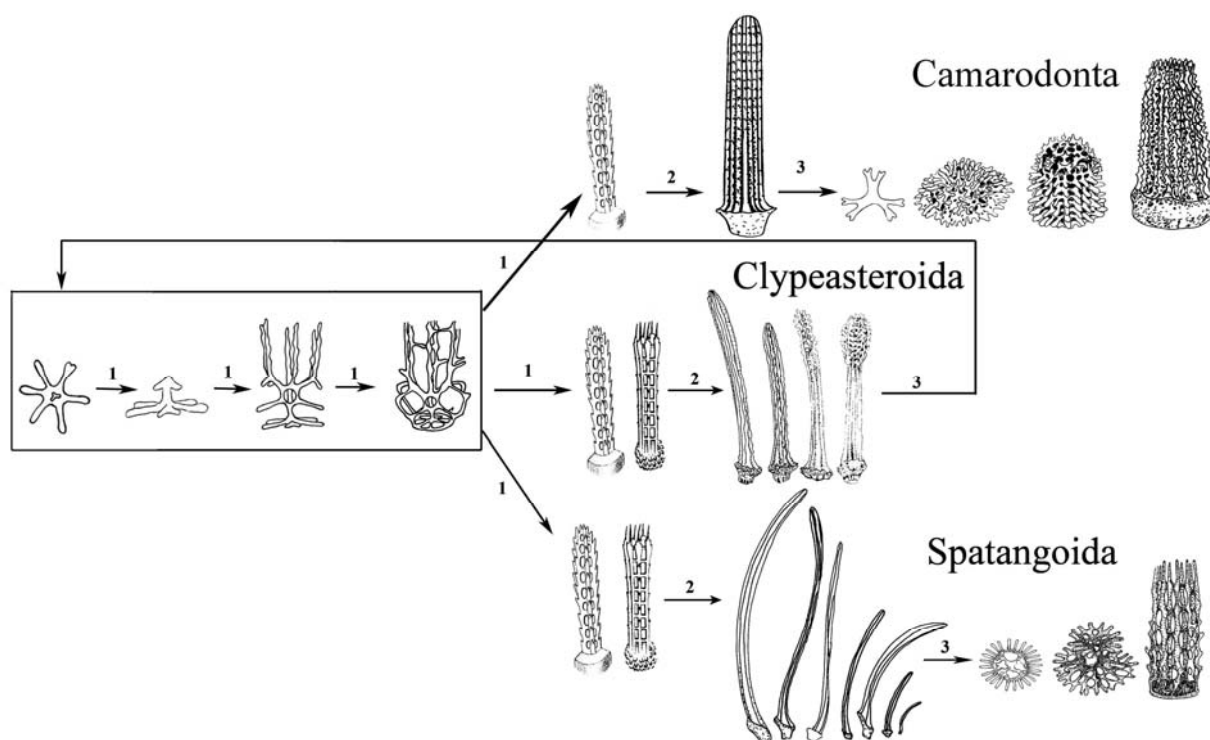


Рис. 1. Формирование структуры скелета дефинитивной иглы у морских ежей из отрядов *Clypeasteroida* и *Spatangoida* на основе дефинитивной иглы ювенильных морских ежей из отряда *Camarodonta*. Условные обозначения: 1 – морфогенез дефинитивной иглы в процессе личиночного спикүлогенеза, 2 – формирование дефинитивной иглы взрослых морских ежей, 3 – морфогенез дефинитивной иглы взрослых морских ежей в процессе регенерации.

Ранее было показано, что формирование скелета дефинитивных игл в процессе личиночного спикүлогенеза у морских ежей из отрядов *Camarodonta*, *Clypeasteroida* и *Spatangoida* происходит согласно общему механизму (Gordon, 1926a, b; Gordon, 1927; Gordon, 1929; Theel, 1982; Yajima, Kiyomoyto, 2006). Согласно этому механизму, срединная часть трехлучевой спикүлы образует отросток, дальнейший рост и ветвление которого приводит к формированию стержня и базальной части иглы. Исследование репаративной регенерации скелета полностью удаленных игл у взрослых морских ежей

данных отрядов показало, что формирование скелета игл взрослых клипеастероидных и спатангоидных морских ежей происходит в соответствии с этапами формирования дефинитивных игл в личиночном спикүлогенезе ежей этих отрядов, а также личиночном спикүлогенезе дефинитивных игл правильных морских ежей из отряда Camarodonta.

Таким образом, первичная спикүла растущей иглы у рассмотренных нами видов плоских морских ежей (*Scaphechinus mirabilis*, *Scaphechinus griseus* и *Echinarachnius parma*) появляется на поверхности панциря по истечении семи суток после ее удаления и имеет шестилучевую структуру. В процессе роста каждый из шести лучей спикүлы образует по два латеральных отростка. Далее, латеральные отростки каждого луча срастаются с латеральными отростками соседних лучей, образуя базальное кольцо. Базальное кольцо является одним из главнейших компонентов основания иглы. Одновременно с образованием латеральных отростков, в центре спикүлы происходит формирование трехлучевого срединного зачатка. Последующий рост и ветвление срединного зачатка приводит к формированию стержневой части иглы. Благодаря апикальному росту, каждый из трех лучей срединного зачатка формирует по одному трехлучевому медиальному зачатку. Относительно продольной оси растущей иглы, один из лучей медиального зачатка является абаксиальным, а другие два – адаксиальными. Абаксиальный луч в процессе роста присоединяется к базальному кольцу, закладывая основу будущей туберкулы иглы. Адаксиальные лучи дихотомически разветвляются и образуют по четыре или по два (у милиарной иглы) отростка, располагающихся под углом относительно продольной оси. Количество этих отростков соответствует количеству ребер взрослых игл. Из срединной части каждого из отростков параллельно продольной оси иглы образуется продольный отросток. Этот отросток впоследствии растет по трем направлениям относительно продольной оси иглы: аксиально, абаксиально и латерально.

Аксиальный рост является первичным и обеспечивает образование продольных трабекул иглы. В процессе роста иглы в абаксиальном направлении, происходит формирование продольных отростков. Латеральный рост приводит к появлению поперечных перемычек между соседними продольными трабекулами. Так образуется первое структурное кольцо стержневой части иглы. Образование первого кольца у растущей иглы *S. mirabilis* происходит по истечении 15–17 суток, а у *S. griseus* – на 10–15 сутки. У *E. parma* сходная структура образуется на 20 сутки. Дальнейший рост иглы обеспечивается образованием последующих рядов структурных колец вплоть до достижения иглой характерной для нее длины. Продольные отростки соседних структурных колец образуют ряды продольных арок, которые сливаются между собой и

утолщаются посредством вторичного минерального отложения, образуя продольные ребра иглы. Полное развитие удаленных игл занимает 45-50 суток.

В то же время формирование дефинитивной иглы у взрослых морских ежей из отряда *Camarodonta* в процессе регенерации происходит благодаря росту и ветвлению многочисленных первичных отростков.

Однако, в процессе регенерации скелета игл взрослых морских ежей отряда *Spatangoida* первичная спикула имеет многолучевую структуру (более 10 лучей), в отличие от первичной трехлучевой спикулы, на основе которой происходит формирование дефинитивных игл у ювенильных спатангоидов, ювенильных и взрослых клипеастероидов, а также ювенильных представителей отряда *Camarodonta*. Вероятно, большее число лучей первичной спикулы у дефинитивных игл взрослых спатангоидов, обеспечивает им более надежное прикрепление к панцирю.

Значительные различия структуры, а также способов формирования дефинитивных игл у ювенильных и взрослых морских ежей из отряда *Camarodonta*, некоторые различия в начальных стадиях формирования игл у ювенильных и взрослых спатангоидов позволяют предполагать о существовании параллельной эволюции структуры дефинитивных игл морских ежей на разных стадиях онтогенеза. Согласно современным представлениям, формирование неправильных морских ежей происходило на основе «правильных» предковых форм (Treatise..., 1966; Kroh, Smith, 2010). Временный характер ювенильной стадии дефинитивной иглы у морских ежей отряда *Camarodonta* и сохранение этой стадии на протяжении всего онтогенеза *Clypeasteroidea* и *Spatangoida* позволяет предполагать о происхождении игл клипеастероидных и спатангоидных морских ежей на основе ювенильной стадии дефинитивных игл *Camarodonta*, т. е. в данном случае имел место педоморфоз.

Педоморфоз достаточно часто выступает в качестве механизма эволюционных преобразований в различных систематических группах живых организмов (Смирнов, 1991). Педоморфное происхождения тех или иных структур часто обнаруживается у глубоководных беспозвоночных в связи с неблагоприятными факторами среды, в результате чего происходит физическое недоразвитие половозрелых форм (Миронов, 1980; Райский, 2010). У плоских морских ежей отрядов *Clypeasteroidea* и *Spatangoida* педоморфное происхождение игл, вероятно, имеет характер онтогенетической преадаптации «правильных» предков. Как отмечают Соловьев и Марков (2004), возникновение неправильных морских ежей в юре было связано в первую очередь с освоением закапывающегося образа жизни и детритофагии. Вероятно, структура

дефинитивных игл ювенильных морских ежей из отряда *Samarodonta* специализировалась в совокупность нескольких морфофункциональных типов дефинитивных игл плоских и сердцевидных морских ежей.

Исследование ювенильных морских ежей из разных отрядов, проведенное Эмлетом (Emlet, 2010), показало, что они обладают определенным количеством внешних придатков панциря. По его мнению, совокупность различного числа амбулакральных ножек, педицеллярий, сферидий и игл у ювенильных морских ежей представляют собой комбинацию различных модулей развития этих структур, скомбинированных путем гетерохронии.

В результате сравнительного анализа способов формирования скелетной структуры ювенильных и дефинитивных игл морских ежей из разных отрядов на разных стадиях онтогенеза становится очевидным, что становление структуры дефинитивных и ювенильных игл морских ежей в каждом отряде происходило путем комбинирования и преобразования стадий формирования ювенильных и дефинитивных игл исторически предшествующих отрядов морских ежей (рис. 2).

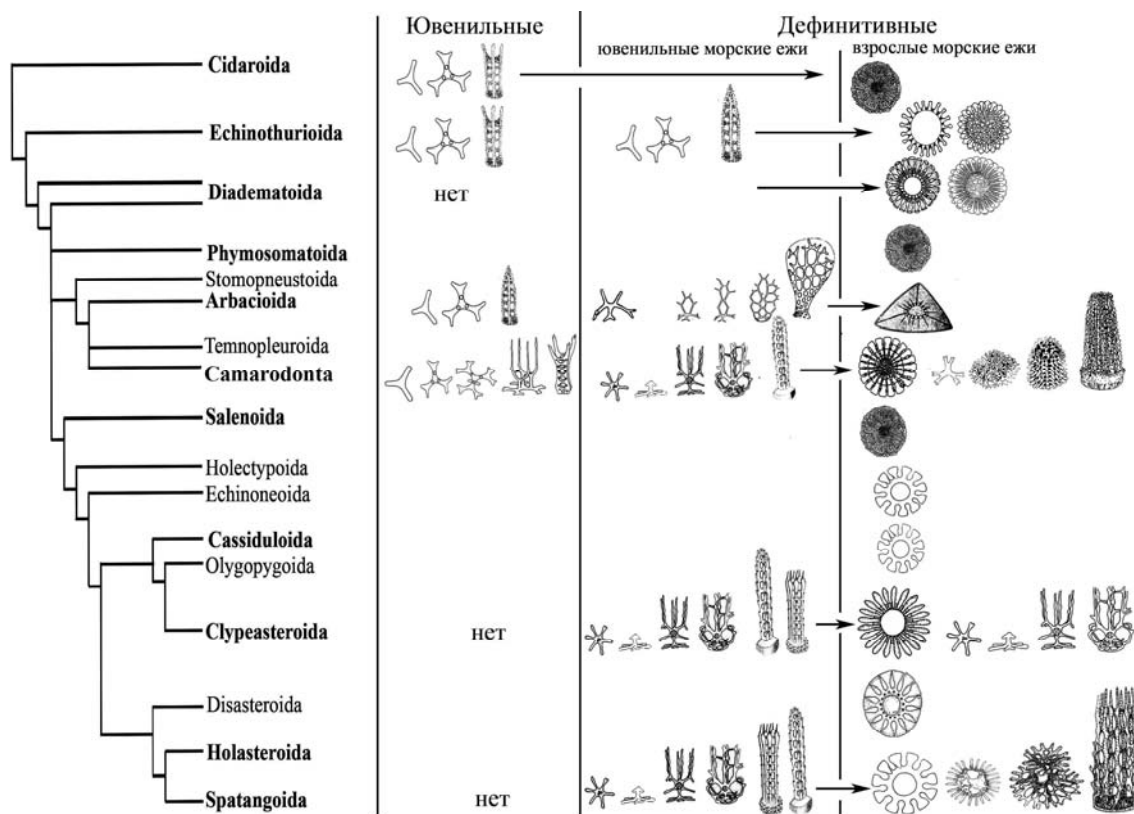


Рис. 2. Формирование структуры ювенильных и дефинитивных игл морских ежей (слева приведено модифицированное древо класса Echinozoa по: Kroh, Smith, 2010).

Согласно данным представленным в литературе, у ювенильных морских ежей древнейшего отряда *Cidaroida* присутствуют только многочисленные ювенильные иглы (Emlet, 2010). Как отмечает Мортенсен (Mortensen, 1928), ювенильные иглы, впоследствии дальнейшего роста становятся базальной частью дефинитивной иглы взрослого животного. Ювенильная игла формируется из трехлучевой спикулы, которую принято считать маркером личиночного спикулогенеза иглокожих (Gordon, 1929). Каждый из трех лучей спикулы формирует апикальный отросток, формирующий продольные трабекулы иглы. Латеральные отростки соседних продольных трабекул сливаются, образуя поперечные мостики. В соответствии с числом лучей первичной спикулы, ювенильные иглы цидароидов имеют три отростка на верхушке.

Дефинитивные иглы у ювенильных цидароидных морских ежей отсутствуют (Emlet, 2010). Во взрослом состоянии структура дефинитивных игл отличается от описанной выше структуры ювенильных игл. Основное отличие заключается в отсутствии аксиальной полости и наличии плотного, лабиринтовидного стереома в сердцевине. Дефинитивные иглы, сердцевина которых заполнена стереомом впервые появляются у морских ежей данного отряда.

В отряде *Echinothurioida* у ювенильных морских ежей присутствуют как многочисленные ювенильные, так и одиночные дефинитивные иглы (Emlet, 2010). Формирование игл данных типов происходит согласно вышеописанному процессу образования ювенильных игл цидароидов. Структура ювенильных игл в данном случае подобна ювенильным иглам цидароидов, на вершине которых присутствуют три отростка, соответствуя трем вертикальным трабекулам (Mortensen, 1935). Дефинитивные иглы, в отличие от ювенильных, имеют одну вершину, в которую объединяются три вертикальные трабекулы, окружающие аксиальную полость. Дефинитивные иглы взрослых морских ежей также имеют аксиальную полость, хотя их структура в некоторой степени отличается от структуры ювенильных игл. Таким образом, аксиальная полость сохраняется на протяжении всего онтогенеза животного.

Как показывают исследования личиночного развития *Arbacia punctulata* (Gordon, 1929), формирование личиночных игл в отряде *Arbacioida* происходит подобно формированию ювенильных игл у цидароидов и эхинотуриоидов. Однако, формирование скелета дефинитивных игл у представителей данного отряда происходит уникальным способом, что приводит к формированию весловидных игл, характерным только для морских ежей данного отряда. Как было отмечено выше, в отряде *Сamarodonta* структура дефинитивных игл ювенильного морского ежа принципиально отличается от структуры

дефинитивных игл взрослого морского ежа. У взрослых шаровидных морских ежей игла не имеет аксиальной полости. Сердцевина дефинитивной иглы образована лабиринтоподобным стереомом и расположенными вокруг него продольными ребрами (Винникова, Дроздов, 2011). Очевидно, структура ювенильных игл у морских ежей отряда *Camarodonta* возникла на основе преобразования исходного способа формирования ювенильных игл на основе трехлучевой спикулы, свойственного примитивным отрядам. Как отмечает И. Гордон (Gordon, 1926), первичная спикула будущей ювенильной иглы имеет трехлучевую структуру. В процессе апикального роста, из срединной части двух лучей этой спикулы начинают формироваться вертикальные трабекулы. В срединной части третьего луча спикулы формируется продольный отросток. Этот отросток дихотомически разветвляется и образует два, расположенных под углом, отростка, которые, впоследствии, образуют продольные трабекулы ювенильной иглы. Дальнейший рост и формирование поперечных мостиков между трабекулами повторяет этапы морфогенеза скелета вышеупомянутых отрядов. Таким образом, в морфогенезе скелета ювенильных игл наблюдается отчетливый переход от иглы с тремя – к игле с четырьмя вертикальными трабекулами. В основе будущей дефинитивной иглы находится шестилучевая спикула. Как было рассмотрено выше, формирование иглы из шестилучевой первичной спикулы явилось основой для появления дефинитивных игл в отрядах *Clypeasteroidea* и *Spatangoida* подкласса *Irregularia*.

3.3. Сравнительные аспекты морфогенеза скелета дефинитивных игл морских ежей в процессе репаративного роста

В результате изучения восстановительного роста частично поврежденных и полностью удаленных игл обнаружены общие этапы формирования продольных ребер у игл с аксиальной полостью и без аксиальной полости. У плоских и шаровидных морских ежей образование продольных ребер происходит в результате абаксиального роста регенерирующей иглы. Отростки продольных трабекул образуют ряды небольших продольных арок. Эти арки, сливаясь между собой, утолщаются посредством вторичного минерального отложения и образуют ряды продольных септ. Для игл камародонтных морских ежей характерно гораздо большее число слоев продольных септ, обуславливающих толщину иглы, чем для игл плоских морских ежей (рис. 3). Таким образом, продольные ребра игл неправильных морских ежей представляют собой «недоразвитые» продольные ребра игл шаровидных морских ежей из отряда *Camarodonta*.

Данный факт иллюстрирует явление гетерохронного сдвига, в связи с которым произошла ювенилизация дефинитивных игл неправильных морских ежей.

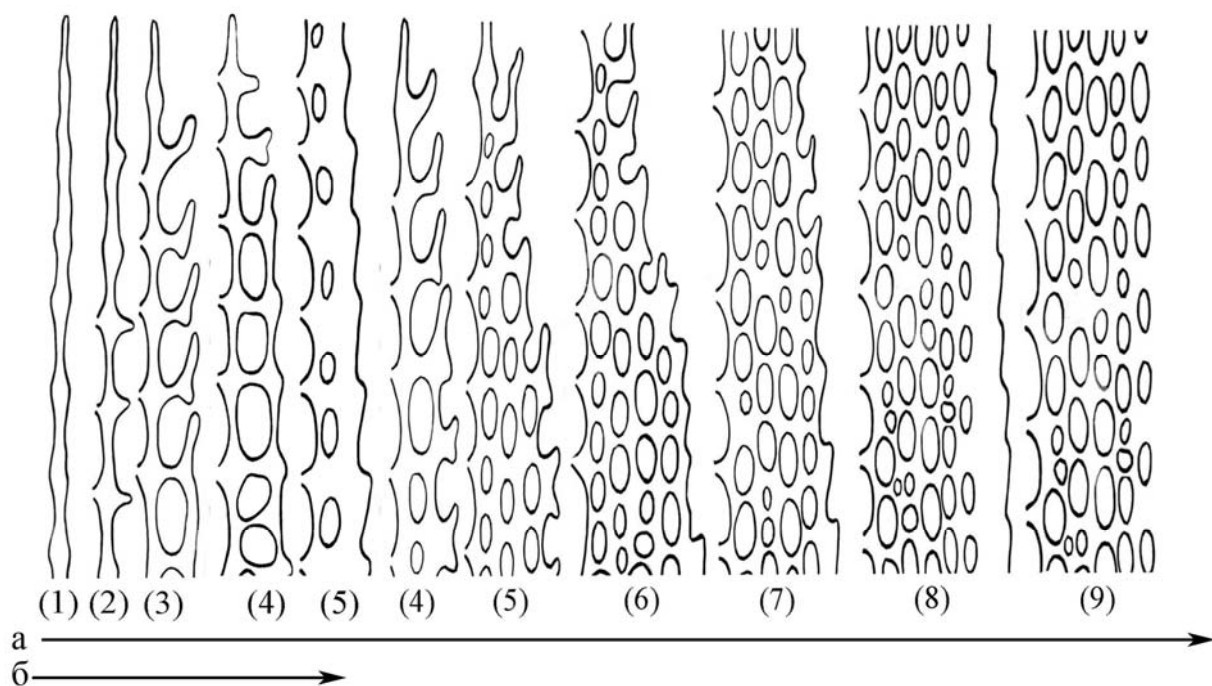


Рис. 3. Схема формирования ребер иглы морских ежей (а – *Camarodonta*, б – *Clypeasteroida* и *Spatangoida*).

Как отмечает Короткова (1997), при экспериментальном изучении репаративной регенерации, восстановленный в процессе регенерации скелет не полностью идентичен нормальному, т.е. восстановление осуществлялось атипично с элементами компенсаторных процессов. Однако, собственные исследования показали, что репаративный морфогенез скелета полностью удаленных и частично поврежденных игл плоских морских ежей, а также полностью удаленных игл шаровидных морских ежей приводит к полному восстановлению исходной структуры иглы. Лишь при регенерации частично поврежденных игл шаровидных морских ежей происходит заметное запаздывание и последующая остановка латерального роста, в результате чего, при достижении исходной длины игла в восстановленной части имеет относительно тонкий стержень. Так, если диаметр срединной части исходной иглы *S. intermedius* составлял 1000 мкм, то у вновь образованной иглы, он не превышал 800 мкм.

3.4. Сравнительные аспекты ультраструктуры гамет морских ежей

В результате сравнительного исследования спермиев *Echinocardium cordatum* s. str. из Средиземного моря и *Echinocardium* sp. из Японского моря обнаружены значительные отличия их ультраструктуры. Согласно проведенному анализу (табл. 1), основные отличия спермиев этих двух видов находятся в размерных соотношениях постакрсомного стержня и ядра, а также в размерах спермиев, размерах постакрсомного стержня.

Таблица 1. Сравнительный анализ ультраструктуры спермиев сердцевидных морских ежей

Структура Вид	Ядро		Акросома		
	Длина	Ширина	Длина постакрсомного стержня	Отношение длины ядра к длине постакрсомного стержня	Отношение длины постакрсомного стержня к расстоянию от акросомного пузырька до ядра
<i>E. cordatum</i> s.str.	4,61±0,002	2,04±0,02	2,64±0,006	1,74±0,005	3,75±0,04
<i>E. sp.</i>	2,55±0,03 ***	1,08±0,03 ***	0,84±0,005 ***	3,03±0,04 ***	3,50±0,01 ***

*** $p < 0,001$

Длина выступающей за пределы ядра части акросомы спермия *Echinocardium* sp. составляет около 0,35 мкм. Длина ядра достигает 2,55 мкм. Диаметр митохондрии – 1 мкм, под ней ближе к периферии располагаются две липидные капли. Спермий *Echinocardium* s. str. *cordatum* из Средиземного моря имеет сильно удлинённый постакрсомный стержень. Длина выступающей за пределы ядра части акросомы около 0,7 мкм. Длина ядра – 4,61 мкм. Диаметр митохондрии также составляет 1 мкм. Считается, что морской еж *Echinocardium cordatum* обитает преимущественно в умеренных широтах северного и южного полушарий Тихого и Атлантического океанов. Попытки разделить по морфологическим признакам столь широко распространённый вид на несколько отдельных видов не привели к успеху (Higgins, 1974, 1975). На основании различий ультраструктуры спермиев и игл *Echinocardium* ex gr. *cordatum* мы предполагаем, что в Средиземном и Японском море обитают два разных вида рода *Echinocardium*.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены общие стадии морфогенеза скелета полностью удаленных дефинитивных игл взрослых морских ежей из отрядов Clypeasteroidea, Spatangoidea в процессе репаративного роста и дефинитивных игл ювенильных морских ежей из отрядов Clypeasteroidea, Spatangoidea и Camarodonta в процессе личиночного спикулогенеза.

Временный характер ювенильной стадии дефинитивной иглы у морских ежей отряда Camarodonta и сохранение этой стадии на протяжении всего онтогенеза Clypeasteroidea и Spatangoidea позволяет предполагать пedomорфное происхождение игл клипеастероидных и спатангоидных морских ежей на основе ювенильной стадии дефинитивных игл правильных морских ежей.

2. Обнаружены значительные отличия в строении и способах формирования дефинитивных игл у ювенильных и взрослых морских ежей из отряда Camarodonta, а также различия в начальных стадиях формирования игл у ювенильных и взрослых морских ежей отряда Spatangoidea. Это позволяет предполагать параллельный характер эволюции дефинитивных игл морских ежей на разных стадиях онтогенеза.

3. Сохранение аксиальной полости в иглах морских ежей на протяжении всего онтогенеза является апоморфным состоянием. Присутствие в онтогенезе морских ежей из отряда Camarodonta ювенильных игл с аксиальной полостью и дефинитивных игл без нее является плезиоморфным состоянием, характерным для древнейшего отряда Cidaroida и отрядов Salenoida, Arbacioidea, Phymosomatoida.

4. Репаративный морфогенез скелета полностью удаленных игл морских ежей приводит к полному восстановлению исходной структуры иглы. При регенерации частично поврежденных игл у морских ежей из отрядов Spatangoidea и Clypeasteroidea также происходит полное восстановление, а у морских ежей из отряда Camarodonta происходит запаздывание и последующая остановка латерального роста, в результате чего наблюдается недоразвитие стержня по толщине.

5. В соответствии с концепцией конструктивного морфологического многообразия, базальные отряды морских ежей Cidaroida и Echinothurioida демонстрируют гораздо более широкий спектр морфологии игл, нежели эволюционно более молодые отряды Camarodonta, Clypeasteroidea и Spatangoidea.

6. На основе значительных различий в строении игл и спермиев показано, что вид морских ежей, определяемый как *Echinocardium cordatum*, представлен в мировой фауне по крайней мере двумя криптическими видами *E. cordatum* s. str. из Средиземное моря и *Echinocardium* sp. из Японского моря.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Винникова В.В., Дроздов А.Л. Ультраструктура игл морских ежей семейства Strongylocentrotidae // Зоол. журн. 2011. Т. 90, № 5, С. 573–579
2. Дроздов А.Л., Винникова В.В. Морфология гамет морских ежей залива Петра Великого Японского моря // Онтогенез. 2010. Т. 41, № 1, С. 47–57

Публикации в материалах конференций:

1. Шарманкина В.В., Блерш О.А. Ультраструктура гамет морских ежей залива Петра Великого Японского моря // Тезисы докладов конференции студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ «Морская биота», 28 апреля 2006 г., Владивосток. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. С. 12.
2. Винникова В.В., Дроздов А.Л. Ультраструктура игл правильных морских ежей семейства Strongylocentrotidae // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток, 7–14 сентября 2009 г.: сборник трудов. Владивосток: ДВО РАН, 2009. С. 9.
3. Каретин Ю.А., Винникова В.В. Нелинейная морфометрия игл морских ежей сем. Strongylocentrotidae // XIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток, 7–14 сентября 2010 г.: сборник трудов. Владивосток: ДВО РАН, 2010. С. 27.
4. Винникова В.В. Ультраструктурное исследование регенерации игл шаровидных и плоских морских ежей // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии. Материалы IX региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2010. С. 48–49.
5. Vinnikova V.V., Drozdov A.L. The spine skeleton morphogenesis in Echinoida and Clypeastreoida orders of sea urchins // Embryology of Marine Invertebrates. N.A. Pertsov White Sea Biological Station. Department of Biology. M.V. Lomonosov Moscow State University, 4–21 July 2010: Course programme and book of abstracts. Moscow, 2010. P. 31.
6. Vinnikova V.V., Drozdov A.L. Comparison of gamete morphology in sea urchins from Peter the Great Bay, Sea of Japan // Embryology of Marine Invertebrates. N.A. Pertsov White Sea Biological Station. Department of Biology. M.V. Lomonosov Moscow State University, 4–21 July 2010: Course programme and book of abstracts. Moscow, 2010. P. 30.
7. Винникова В.В., Дроздов А.Л. Педоморфное происхождение дефинитивных игл клипеастероидных и спатангоидных морских ежей // Тезисы Российской конференции по иглокожим, Москва, 7–8 февраля 2011 г. М.: Институт океанологии им. П.П. Ширшова, 2011. С. 9.
8. Дроздов А.Л., Винникова В.В. Эволюция гамет иглокожих // Тезисы Российской конференции по иглокожим, Москва, 7–8 февраля 2011 г. М.: Институт океанологии им. П.П. Ширшова, 2011. С. 15.

Винникова
Виктория Владимировна

**УЛЬТРАСТРУКТУРА И МОРФОГЕНЕЗ СКЕЛЕТА ИГЛ
МОРСКИХ ЕЖЕЙ**

03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Зак. № 40п. Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл. п. л. 1,0. Тираж 100 экз.
Подписано в печать 27.05.2011 г.
Печать офсетная с оригинала заказчика.

Отпечатано в типографии ОАО «Дальприбор»
690105, г. Владивосток, ул. Бородинская, 46/50,
тел.: 32-70-49