



УДК 597.556.35:591.3:57.018.6:591.13

А. Н. Ханайченко канд. биол. наук, с. н. с., **Ю. Е. Битюкова** канд. биол. наук, с. н. с.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины,
Севастополь, Украина

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОМАТОФОРНОГО КОМПЛЕКСА КАМБАЛЫ КАЛКАН *PSETTA MAXIMA* VAR. *MAEOTICA* В ОНТОГЕНЕЗЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ

Сравнение влияния пищевой цепи на развитие пигментации (хроматофорного комплекса) у камбалы калкан *Psetta maxima* var. *maeotica* проводили от начала экзогенного питания до начала метаморфоза (3 - 18 сут) и от начала до последней стадии метаморфоза (18 – 60 сут). Группы калкана (в двух повторностях, из однородных партий икры) содержали в разных пищевых цепях: либо в типично морской, состоящей из культивируемых каланоидных копепод, *Acartia tonsa* (группа MZ), либо в искусственной, состоящей из солонатоводных коловраток *Brachionus plicatilis* и метанауплиев *Artemia franciscana* (группа BZ). Для аппроксимации жирнокислотного состава применяли единую схему насыщения, в результате которой у всех кормовых организмов были близкие значения содержания и соотношения ДГК и ЭПК. Обе группы калкана были нормально пигментированы на макроуровне: симметрично до начала и асимметрично в конце метаморфоза - равномерно пигментированы с левой стороны и не пигментированы с правой. Различия хроматофорных комплексов групп MZ и BZ проявились на микроуровне. До начала метаморфоза (18 сут) личинки группы MZ были пигментированы чётко распределёнными по миотомам разветвлёнными красными липофорами, чередующимися с серыми, хорошо разветвлёнными меланофорами, образующими свободную от меланофоров зону вдоль латеральной линии. Для группы BZ было характерно более хаотичное распределение распределёнными тёмных чёрных неправильно организованных меланофоров, превалирующих над желтовато-оранжевыми неразветвлёнными липофорами, и отсутствие свободной от меланофор зоны у латеральной линии. Разделение на разные пищевые цепи с начала метаморфоза приводило к различиям в хроматофорных комплексах групп MZ и BZ по цвету, структуре и распределению меланофоров, липофоров и, особенно, гуанофоров. Предполагается, что изменения в дифференциации хроматофоров связаны с экспрессией генов, модифицируемых различиями в составе каротиноидов пищевых цепей.

Ключевые слова: калкан, пищевая цепь, пигментация, меланофор, липофор, гуанофор, дифференциация

Для метаморфизированных особей камбалы калкан, *Psetta maxima* var. *maeotica*, также как и для близкородственного вида - атлантического тюрбо, *Psetta maxima*, и всех видов Pleuronectiformes, в норме характерно отсутствие симметричной пигментации [3]. Личинки билатерально симметричны только до начала метаморфоза. В процессе метаморфоза, происходящего в течение первых двух месяцев жизни, организм камбал претерпевает изменения, связанные с развитием асимметрии всего тела и внутренних органов. Одновременно с перестройкой организма происходит миграция правого глаза на левую сторону и развитие асим-

метрии в окраске. У полностью и правильно метаморфизированной камбалы левая («зрячая») сторона тела должна быть полностью пигментирована и иметь серо-коричневый оттенок, обусловленный равномерным распределением меланофоров (МФР) по поверхности тела, в то время как правая («слепая») сторона тела полностью утрачивает окраску [1].

Аномалии пигментации камбалообразных встречаются как в природных популяциях, так и при искусственном выращивании. Экспериментальные исследования показали, что процент аномалий пигментации у молоди камбалообразных может быть достоверно

определён ко времени завершения метаморфоза, в возрасте около 60 сут; критическим временем возникновения аномалий пигментации считают ранние этапы развития, в возрастном диапазоне 2 – 3 недели после выклева [8].

На ранних стадиях развития калкан питается только живыми кормами. При экстенсивном методе культивирования личинки питаются морским зоопланктоном, преимущественно, каланоидными копеподами. При интенсивном методе выращивания личинок кормят солоноватоводными коловратками *Brachionus plicatilis* Muller и науплиями рачков *Artemia* spp. из гиперсолёных водоёмов. Наибольшее количество аномалий пигментации у молоди камбалообразных наблюдается именно в последнем случае. Напротив, у молоди камбалообразных, питавшейся на ранних этапах развития диким морским зоопланктоном, состоящим, в основном из каланоид, аномалии пигментации не наблюдаются [9, 11]. Даже при частичном добавлении морских каланоид в рацион личинок процент правильно пигментированных особей очень высок. Возникновение аномалий пигментации связывают с несбалансированным по незаменимым компонентам питанием личинок, которые неспособны к их самостоятельному синтезу. Так, одним из факторов, влияющих на характер пигментации, является низкое и диспропорциональное соотношение высоконасыщенных жирных кислот (ВНЖК), а именно, докозагексаеновой кислоты (ДГК) и эйкозапентаэновой (ЭПК) или низкое соотношение ДГК/ЭПК. Повышение соотношения ДГК/ЭПК в живых кормах нормализует развитие нормальной пигментации камбаловых [8].

Аномалии пигментации камбалообразных считают результатом хаотического распределения тёмных областей, с большой плотностью меланофоров, чередующихся с участками белого цвета, полностью лишёнными меланофоров на зрячей стороне, или полной или частичной пигментации (аномальным присутствием МФР) слепой стороны тела [10]. Одна-

ко окраска дермы обусловлена пространственным распределением и цветовой гаммой ассоциации трёх классов хроматофоров (меланофоров, липофоров и гуанофоров или иридофоров), в совокупности составляющих функциональную единицу дермы. Каждый тип хроматофоров имеет специфическую морфологию, состав пигмента и локализацию. Обычно липофоры, подразделяемые на жёлтые неразветвленные (ксантофоры) и красные разветвленные (эритрофоры) расположены в верхнем слое дермы, серебристые гуанофоры - непосредственно под ними, а дермальные тёмные меланофоры формируют базальный слой. Разветвленным хроматофорам (меланофорам и эритрофорам) присуще два основных состояния: контракции, когда пигментные гранулы агрегированы в центросоме, и дисперсии (или экспансии), когда пигментные гранулы распределены по разветвлениям (дендритам), вдоль разветвлений микротрубочек от центра к периферии хроматофора. Потемнение дермы рыб связано с состоянием дисперсии, просветление – с состоянием контракции меланофоров. За тёмные и светлые участки ответственны, соответственно, поглощающие свет меланофоры и отражающие свет гуанофоры. Ксантофорам и эритрофорам обычно отводится роль жёлтого фильтра [2].

Несмотря на важность характера пигментации камбаловых как в естественных популяциях, так и при искусственном культивировании, сведения об особенностях формирования пигментного комплекса камбалы калкан в естественных условиях от ранних стадий развития до завершения метаморфоза отсутствуют, и биология калкана на ранних стадиях развития исследована только на особях, выращенных в лабораторных условиях [1]. Литературных данных по развитию пигментного комплекса в онтогенезе калкана нет.

Целью настоящей работы было изучение влияния питания личинок калкана на развитие их пигментного комплекса. Сравнение характеристик хроматофоров калкана на разных

этапах развития от начала экзогенного питания до завершения метаморфоза производили при кормлении личинок морским или солоноватоводным зоопланктоном в экспериментах.

Материал и методы. *Культивирование живых кормов.* В период развития калкана в естественных условиях морские копеподы в прибрежной зоне представлены преимущественно акарциями. Поэтому для кормления личинок калкана в экспериментах в качестве морского зоопланктона (MZ) использовали науплиальные и копеподитные стадии акарции *Acartia tonsa* [7], а в качестве неморского зоопланктона (BZ) - солоноватоводных коловраток *B. plicatilis* и науплиальные стадии ракообразных *Artemia franciscana* [1]. Все зоопланктонные организмы выращивали в стандартных температурных условиях ($17 \pm 2^\circ\text{C}$) и насыщали по унифицированной собственной методике, при которой содержание незаменимых ВНЖК в кормовых организмах варьирует в пределах: ДГК - 10.9 - 14.0 %; ЭПК - 3.4 - 3.8 % при соотношении ДГК/ЭПК - 3.2 - 3.7 [6], приближаясь к естественному уровню ВНЖК у акарций из весенних популяций (ДГК - 17.5 % и ЭПК - 6.5 % от общего содержания жирных кислот).

Культивирование личинок камбалы калкана. Эксперименты проводили на однородных партиях личинок, полученных при искусственном оплодотворении от диких производителей и разделённых на экспериментальные группы в двух повторностях, при одинаковых температурных и гидрологических условиях выращивания и одинаковой плотности как солоноватоводного, так и морского кормового зоопланктона.

(1) Для изучения влияния питания на формирование пигментного комплекса калкана в дометаморфозный период, личинок к началу экзогенного питания (3 сут) делили на 2 группы. Одну группу (MZ1) кормили морским зоопланктоном (науплиальными стадиями до 12 сут и смесью старших науплиальных и ранних копеподитных стадий акарций до 18 сут), вто-

рую (BZ1) - солоноватоводными коловратками до 14 сут, и с добавлением метанауплиев артемий до 18 сут.

(2) Для изучения влияния изменений в пищевой цепи на развитие пигментации у калкана в период метаморфоза, личинок выращивали сначала по стандартной интенсивной технологии, т.е. кормили коловратками, к которым с 14 сут. добавляли метанауплиев артемий. С возраста 18 сут. их делили на две группы (в 2-х повторностях). До 60 сут. одну группу (BZ2) продолжали кормить метанауплиями артемий, другую (MZ2) – старшими копеподитными стадиями акарций.

Эксперименты проводили в цилиндрических бассейнах объёмом 40 л при начальной плотности 20 личинок на 1 л (1) и 2 личинки на 1 л (2). Концентрацию живых кормов корректировали дважды в сутки в течение всего периода выращивания и поддерживали на уровне (1) 2 экз./мл в течение раннего периода развития и (2) 0.2 экз./мл в течение метаморфоза, т.е. *ad libitum* при заданных плотностях личинок. Все эксперименты проводили в двух повторностях.

Методы оценки пигментации камбалы калкан. Стандартную длину личинок – SL (мкм) определяли при измерении длины от рыла до конца хорды (позвоночника) под биноклем при увеличениях (в зависимости от возраста личинок) 8×4 ; 8×2 ; 8×1 ; 8×0.6 .

Состояние пигментного комплекса личинок калкана оценивали в процессе их развития на основании изменения цветности покровов, обусловленной структурой, распределением и соотношением хроматофоров разного типа в поверхностном слое дермы. Идентификацию хроматофоров проводили по их структуре и цвету [3]: меланофоры (МФР) – хроматофоры коричневого и чёрного оттенков, имеющие разветвлённую структуру, липофоры (ЛФР) - неразветвлённые жёлтых оттенков ксантофоры (КФР) и разветвлённые красных оттенков эритрофоры (ЭФР); гуанофоры (ГФР), содержащие кристаллы гуанина, имеющие

светоотражающие характеристики. Наличие и распределение МФР и ЛФР (КФР и ЭФР) исследовали у личинок в возрастном диапазоне 3 – 18 сут; МФР, ЛФР и ГФР – 20 – 60 сут.

Совокупность хроматофоров, отчётливо просматриваемых через тонкий эпидермис личинок, исследовали под микроскопами МБС-9 (8×4; 8×2; 8×1; 8×0.6), МБИ-2 (3.5×10; 10×10; 10×20) и Jenalumar (10×6.3; 10×12.5; 10×25). Снимки получены с помощью зеркального фотоаппарата «Зенит», цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix 4500 и цифровой насадки на микроскоп Premiere.

Результаты Развитие пигментного комплекса камбалы калкан на ранних стадиях онтогенеза. Первые пигментные клетки у калкана дифференцируются ещё в процессе эмбриогенеза, в конце III этапа, в виде одиночных точечных МФР на спинной стороне передней части туловища [1]. На IV этапе эмбрионального развития, во время дифференциации органов, на жировой капле и желточном мешке появляются одиночные МФР. На V этапе дифференцируются ЛФР, сначала на спинной стороне, затем по всему туловищу, придавая телу эмбриона интенсивный розовый цвет. Перед выклевом на туловище эмбриона расположено много ЛФР и крупноклеточных МФР.

После выклева (в возрасте 1 сут, SL = 2.9 - 3.18 мм) туловище почти прозрачных личинок окрашено в ярко-розовый цвет рассеянными вдоль всего туловища разветвленными ЛФР. На фоне ЛФР располагаются крупные МФР. Отдельные МФР находятся на желточном мешке и жировой капле. На прозрачной плавниковой складке в середине хвостового отдела образуется пигментный пояс, состоящий из розовых ЛФР и тёмно-коричневых МФР. На голове и хвостовом стебле ЛФР отсутствуют.

У двухсуточных личинок (SL = 3.1 - 3.2 мм), приобретающих розово-серый цвет за счёт подстилающих липофоров и серых поверхностных меланофоров (рис. 1а), в темпоральном секторе глаза появляется чёрный пигмент, сви-

детельствующий о том, что в клетках пигментного эпителия начинает синтезироваться меланин, происходит меланизация глаза (рис.1б). ЛФР распространяются на головной отдел, в область обонятельных и слуховых капсул и головного мозга (рис.1вс). В туловищном отделе, наряду с ярко-розовыми ЛФР (рис.1с), дифференцируются коричневые МФР с длинными разветвленными отростками (рис.1с). К моменту перехода на активное питание (3 сут, SL = 3.2 - 3.3 мм) нормально питающиеся и растущие личинки становятся светлыми, поскольку МФР, расположенные на туловище, находятся преимущественно в состоянии контракции. Потемнение дермы личинок, обусловленное дисперсией МФР, служит индикатором стресса.

Развитие пигментного комплекса калкана в зависимости от пищевой цепи в предметаморфозный период. После перехода на внешнее питание, на этапе смешанного питания (4 - 5 сут, SL = 3.3 - 3.4 мм) пигментация личинок усиливается: на фоне розового пигмента КФРов, происходит распространение МФР на затылочную область головы и спинную часть туловища. На дорсальной стороне тела вдоль хорды располагается два ряда МФР с чётко выраженным ядром и короткими, насыщенными меланином отростками в состоянии дисперсии (с коричневым ядром и короткими, насыщенными меланином отростками). У МФР, находящихся на вентральной стороне тела (в брюшном отделе) ядро выражено слабо, и в состоянии дисперсии их тонкие отростки образуют в эпидермисе сеть без чётких границ между отростками отдельных клеток.

Первые различия в пигментации личинок, питавшихся зоопланктоном разного происхождения, отмечены через 3 сут после начала питания, в возрасте 6 сут (SL = 3.4 – 3.65 мм). Наблюдается скопление МФР над головным мозгом – зрительными долями, продолговатым мозгом и далее вдоль спинной части туловища по центру. МФР покрывают

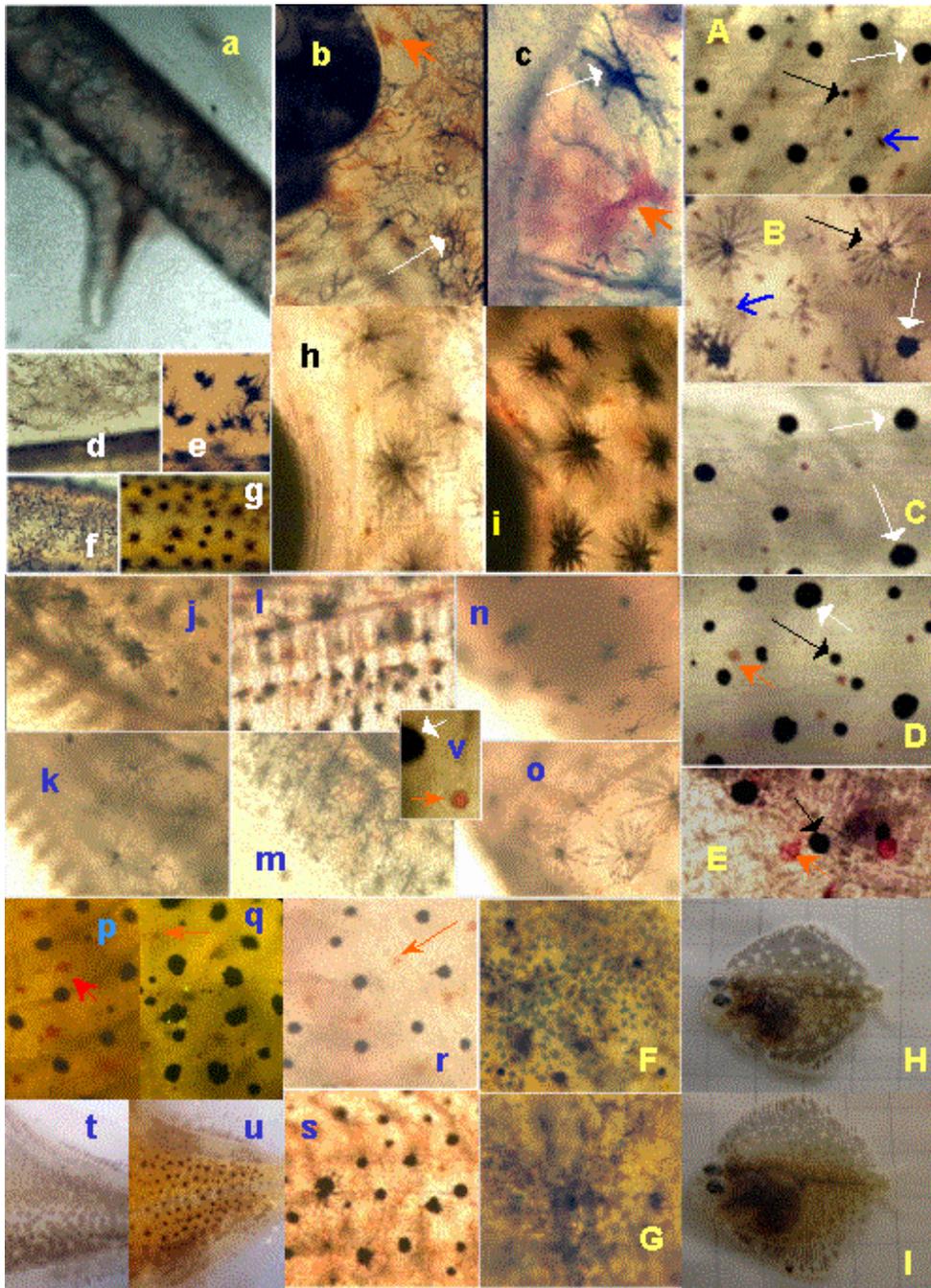


Рис. 1. Хроматофоры поверхностной дермы калкана (цветные фотографии) в возрасте: 2 сут - (a) - в области туловища; (b) область глаза - ув. 3.5 x 10, (c) область глаза - ув. 3.5 x 20; 11 сут - в области: дорсальной плавниковой складки (d) - MZ1, (e) - BZ1; туловищного отдела (f) - MZ1, (g) - BZ1; 18 сут - около глаза (h) - MZ1, (i) - BZ1; у основания птеригофоров (j) - MZ1, (k) - BZ1; у дорсальной плавниковой складки (l) - MZ1, (m) - BZ1; в брюшной части (n) - MZ1, (o) - BZ1; в туловищной части - (p, r) - MZ1, (q, s) - BZ1; хвостовая часть туловища (t) - MZ1, (u) - BZ1; (v) - МФР и ЛФР (ув. . 3.5 x 20); 21 сут - левая сторона туловища (A) - в состоянии контракции; (B) - в состоянии дисперсии; 26 сут - туловища (C) - правая сторона, (D) - левая сторона; (E) - МФР и ЛФР; 60 сут - мальки калкана - (F) - MZ2, (G) - BZ2; гуанофоры (H) - MZ2, (I) - BZ2. Условные обозначения: белая стрелка - лМФР; черная стрелка

- вМФР; голубая стрелка - ГФР; красная стрелка - ЛФР (Объяснения в тексте).

Fig. 1. Chromatophores of the surface derma of the Black Sea turbot (coloured photos) at age: 2 dph - (a) - trunk ; (b) eye area - magnification 3.5 x 10, (c) eye area - magn. 3.5 x 20; 11 dph - region of: dorsal fin (d) - MZ1, (e) - BZ1; middle trunk (f) - MZ1, (g) - BZ1; 18 dph - eye area (h) - MZ1, (i) - BZ1; basis of pteriophores (j) - MZ1, (k) - BZ1; dorsal fin (l) - MZ1, (m) - BZ1; abdominal area (n) - MZ1, (o) - BZ1; middle trunk area (p, r) - MZ1, (q, s) - BZ1; в caudal area (t) - MZ1, (u) - BZ1; (v) - melanophore and lipophore (magn. 3.5 x 20) 21 dph - left side of the middle trunk (A) - contraction, (B) - dispersion; 26 dph - middle trunk area (C) - right side, (D) - left side; (E) - melanophore and lipophore (magn. 3.5 x 20) 60 dph -BST fry - (F) - MZ2, (G) - BZ2; guanophores area - (magn. 3.5 x 20); (H) - MZ2, (I) - BZ2.

Legend: white arrow - larval melanophore; black arrow - adult melanophore; blue arrow - guanophore; red arrow - lipophore (Explanation in the text).

латеральную поверхность тела личинок, слабо пигментированной остается лишь область хорды в туловищном отделе. В области плавательного пузыря, с нижней стороны хорды над кишечником, концентрируются более темные МФР с длинными дендритными отростками. С нижней стороны хорды над заполняющимся воздухом плавательным пузырем и кишечником усиливается перитонеальная пигментация. Пояс МФР с дендритными отростками располагается на уровне 15 – 25 миотома на анальной и 17 – 21 миотома - на дорсальной плавниковых складках. Отростки МФР с дорсальной и вентральной сторон проникают в презумптивную область птеригиофоров плавниковой складки. Множество липофоров сосредоточивается на нижней челюсти, конце рыла, вокруг жировой капли, на плавниковой кайме. Распределение МФР у 6-суточных личинок MZ1 сходно с BZ1, но меланин в МФРах личинок MZ1 более светлого (коричневато-серого) оттенка в более агрегированном состоянии, чем у BZ1. При одинаковом распределении хроматофоров личинки MZ1 оказываются более светлыми и прозрачными, так как их МФР (возможно, меланин) имеют более светлый оттенок, чем у BZ1. Область хорды личинок MZ1 оказывается просветленной (в отличие от BZ1) в результате отсутствия МФР и их отростков практически на всем ее протяжении.

С 7 суток после выклева (SL = 3.6 - 3.9 мм) в области заднего отдела кишечника личинок MZ1 обнаруживаются красные гранулы (вкрапления) пигмента; аналогично расположенные пигментные гранулы у личинок BZ1 окрашены в желто-оливковый цвет. ЛФР личинок MZ1 приобретают кирпично-розовый оттенок, а личинок BZ1 – желтоватый; цветность ЛФР близка к оттенкам пигментных включений у стенки заднего отдела кишечника. Плавниковая кайма у MZ1 личинок к этому времени приобретает оливковый оттенок, у личинок группы BZ1 пигмент на аналогичных участках отсутствует.

На 9 сутки (SL = 3.8 - 4.5 мм) все туловище личинок BZ1 покрыто большим количеством "амебоидных" распластанных разноразмерных темных МФР. МФР распределены по телу беспорядочно, а границы их отростков накладывают друг на друга. Наиболее темные МФР неправильной формы наблюдаются в области печени и заднего кишечника. В сокращённом состоянии МФР личинок BZ1 видно, что их центросомы неправильной формы. Диаметр наиболее мелких МФР около 4 - 8 мкм. Наибольшее количество МФР расположено с вентральной стороны на уровне 10 - 13 миомеров, вдоль нижней челюсти.

У 9-суточных личинок группы MZ1 вдоль дорсальной и вентральной сторон тела определяются упорядоченные ряды МФР, с несколько большей плотностью на вентральной стороне. Между отдельными, расположенными на расстоянии 54 - 72 мкм друг от друга МФР, - чёткие границы. Контрактированные МФР у личинок группы MZ1 имеют форму правильного круга (под световым микроскопом видна только центросома), в диспергированном состоянии ядро (центросома) МФР просветлено; их диаметр в совокупности с хорошо разветвленными тонкими отростками, также расположенными в форме правильного круга, составляет около 40 мкм. В эпителии среднего и заднего отделов кишечника присутствуют многочисленные жировые капли красновато-оранжевого оттенка, диаметром 8 - 12 мкм.

На 11 сут (SL = 4.0 - 5.3 мм) МФР покрывают туловищный (рис.1 fg) и хвостовой отделы поверхности тела личинок до конца сегментированной части тела. Пигментные клетки распространяются на дорсальную и анальную плавниковые складки на уровне 8 - 15 хвостового сегмента (рис.1 de). Голова пигментирована компактными МФР в области головного мозга, редкие клетки имеются на жаберной крышке и вдоль нижней челюсти.

У BZ1-личинок (рис.1eg) МФР неоднородны по форме и расположены более хаотично

но, чем у личинок MZ1; они распространяются в область хорды (рис. 1g) и на дорсальную плавниковую кайму (рис. 1e), а их отростки наползают друг на друга. Напротив, МФР у личинок MZ1 (рис. 1 df) тонко структурированы, в состоянии дисперсии их отростки не соприкасаются. Они хорошо сгруппированы и располагаются ровными рядами по вентральной и дорсальной сторонам туловища вне хорды (рис. 1 f), которая практически свободна от МФР на всём протяжении. На плавниковой кайме МФР образуют тонкую сеть (рис. 1 d). Диаметр контрактированных МФР в среднем больше у личинок BZ1, по сравнению с MZ1: в

области головного мозга 8 - 10 и 4 - 8 мкм; в туловищном отделе (по 4 - 5 МФР на 1 миомер) 20 - 26 и 16 - 20 мкм; в области печени около 10 и 6 мкм, соответственно. Диаметр диспергированных МФР (включая дендрические отростки, расположенные в виде правильного круга), напротив, больше у MZ1, чем у BZ1, за исключением участка над головным мозгом и в хвостовом отделе. Расстояние между центрами МФР в туловищном отделе, закономерно снижающееся по направлению от головы к хвосту у всех личинок, больше у MZ1, чем у BZ1 (табл. 1).

Табл. 1 Характеристики и распределение МФР у 11-суточных личинок калкана групп BZ1 и MZ1
Table 1 Characteristics and distribution of MPR of the larvae (11 dph) groups BZ1 and MZ1

Характеристики МФР Отделы тела	Диаметр диспергированных МФР, в мкм		Расстояние между центрами МФР, в мкм	
	BZ1	MZ1	BZ1	MZ1
Головной мозг	80 - 128	48 - 64	48 - 128	48 - 80
Туловищный	24 - 80	40	176 - 144 - 112 - 64	288 - 240 - 128 - 96
Дорсальный	24 - 32	40 - 60	32 - 48	96 - 80
Вентральный	48 - 80	56 - 84	48 - 80	80 - 112
Брюшной	Трудно определим	64 - 80	Отростки перекрываются	56 - 70 - 80
Хвостовой	48 - 80	20 - 40	48 - 80	96 - 128

Личинки BZ1 приобретают тотальную оливковую окраску тела, состоящего из непрозрачных миомеров; личинки MZ1 - прозрачно-розовые, с розовой хордой на светло-сером фоне прозрачных миомеров.

На 13 сутки (SL = 4.7 - 5.5 мм) личинки MZ1 пигментированы полностью вплоть до хвоста, с тотальной розовато-оранжевой окраской и равномерными вкраплениями розово-кирпичного и рубинового пигментов. В дерме личинок, помимо МФР, присутствуют ЛФР двух видов: жёлто-оранжевые, округлые, крупные, неразветвлённые КФР и яркие, кирпично-рубиновые, мелкие разветвлённые ЭФР. ЛФР распределены по телу равномерно, образуя 4 - 5 нерегулярных рядов в хвостовом отделе и в области пигментного пояса плавниковой каймы. Плотность распределения ЭФР сопоставима с таковой МФР. У личинок BZ1-13-суточного

возраста ЛФР меньше, они отмечаются преимущественно в области головы и гиоидной дуги, в виде округлых неразветвленных клеток, содержащих жёлтый пигмент (КФР). МФР распространены по всему телу, через них редко просвечивает жёлтый пигмент КФР.

У 16-суточных MZ1 личинок (SL = 5.0 - 7.25 мм) в туловищном отделе определяются 8 - 9 дорсовентральных рядов МФР, чётко соответствующих миомерам. Помимо точечных оранжевых КФРов, определяются ряды более крупных, ярко-красных звездообразных ЭФРов. Соотношение ЛФР к МФРам приблизительно 1:1. В дерме BZ1 личинок (SL = 5.15 - 6.95 мм) преобладают крупные чёрные МФР неоднородной формы, неравномерно распределённые с КФРами при соотношении, варьирующем от 6:1 до 2:1.

На 18 сутки после выклева, через 15 сут. различного питания, личинки MZ1 (SL = 6.25 – 9.2 мм) характеризуются более прозрачным телом и правильным чередованием рядов ЛФР (с преобладанием ЭФРов) и МФР тёмно-серого оттенка, соответствующих миомерам (рис. 1p, 1r). В состоянии контракции МФР чётко округлой формы. В состоянии дисперсии у МФР отчётливо видна centrosома, они хорошо структурированы; отростки тонкие, хорошо ветвящиеся (рис. 2A). Сетка серых отростков МФР покрывает поверхность тела и хорошо заметна в области глаза (рис. 1h, 2c), у основания птеригофоров (рис. 1k), на плавниковой кайме (рис. 1m), в брюшной области (рис. 1o). По туловищу МФР распределены по обеим сторонам хорды; в области хорды (включая боковую линию) создаётся свободная от МФР зона (рис. 1t).

В возрасте 18 сут. личинки BZ1 (SL = 6.45 – 9.0 мм) имеют непрозрачное тело, с оранжевым оттенком. В поверхностной дерме наблюдается хаотическое распределение МФР. В состоянии контракции МФР личинок BZ1 – неправильной и разнородной формы (рис. 1q, 1s). В состоянии дисперсии хорошо видна грубая форма интенсивно-чёрных МФР со слабо разветвлёнными несимметричными короткими отростками (рис. 2B), неравномерно чередующихся с мелкими, в основном круглыми ЛФР, преимущественно без отростков. Диаметр контрактированных МФР BZ1 превышает диаметр ЛФР примерно в 3 раза (рис. 1v). При возбуждении и стрессе личинки быстро темнеют в результате дисперсии интенсивно чёрных МФР в поверхностной дерме во всех участках тела: в области головного мозга и глаз (рис. 1i, 2d), у основания птеригофоров (рис. 1j), на плавниковой кайме (рис. 1l), в брюшной области (рис. 1n). Грубо структурированные МФР интенсивно-чёрного цвета расположены в поверхностной дерме туловища неоднородно, их отростки наползают друг на друга, и МФР часто могут быть локализованы в области хорды (рис. 1u).

Различия в пигментном комплексе калкана в период метаморфоза обнаруживаются через несколько суток после разделения личинок на две группы с разными типами питания.

В возрасте 20 сут у личинок MZ2 в районе хорды увеличивается количество ЛФР с включениями в них оранжево-красного пигмента, а хорда на протяжении первых трёх миомеров оказывается свободной от МФР. У личинок BZ2 значительно меньше ЛФР, и они отсутствуют на первых трёх миомерах, в то время как МФР присутствуют на всех миомерах.

Первые отдельные рассеянные клетки гуанофоров у личинок обеих групп обнаруживаются, начиная с 20 сут (рис. 1A, 1B; 2E, 2F), сначала вдоль хвостовой части хорды, а затем в области туловища и головы обеих сторон. Одновременно на левой, будущей зрячей стороне, появляются мелкоклеточные МФР (рис. 1A, 1B). Соотношение КФР к МФР в разных участках поверхностной дермы у личинок группы BZ2 – от 1:1 до 2:1, у группы MZ2 – от 5:1 до 10:1. Группирование гуанофоров в определённых участках дермы левой стороны туловища происходит, начиная с 23 – 24 сут (рис. 2F -2I), плотные скопления гуанофоров впервые отмечены в возрасте 26 - 32 сут (рис. 2J, 2K).

Начиная с 26 сут, у личинок обеих групп отчётливо видны различия в составе хроматофорного комплекса между левой и правой сторонами. Количество МФР на миомерах правой стороны туловища становится значительно меньше (рис. 1C, 2G), по сравнению с левой стороной (рис. 1D). Комплекс хроматофоров правой стороны состоит из редко встречающихся мелких одиночных ЛФР и ГФР, и контрактированных крупноклеточных МФР (рис. 1C), полностью лишённых разветвлений, распределённых равномерно. Возрастание количества МФР на левой стороне происходит за счёт появления, помимо крупноклеточных МФР (кМФР) (рис. 1D, белая стрелка), множества мелкоклеточных МФР (мМФР) (рис. 1D, чёрная стрелка); на 26 сут их соотношение по туловищу

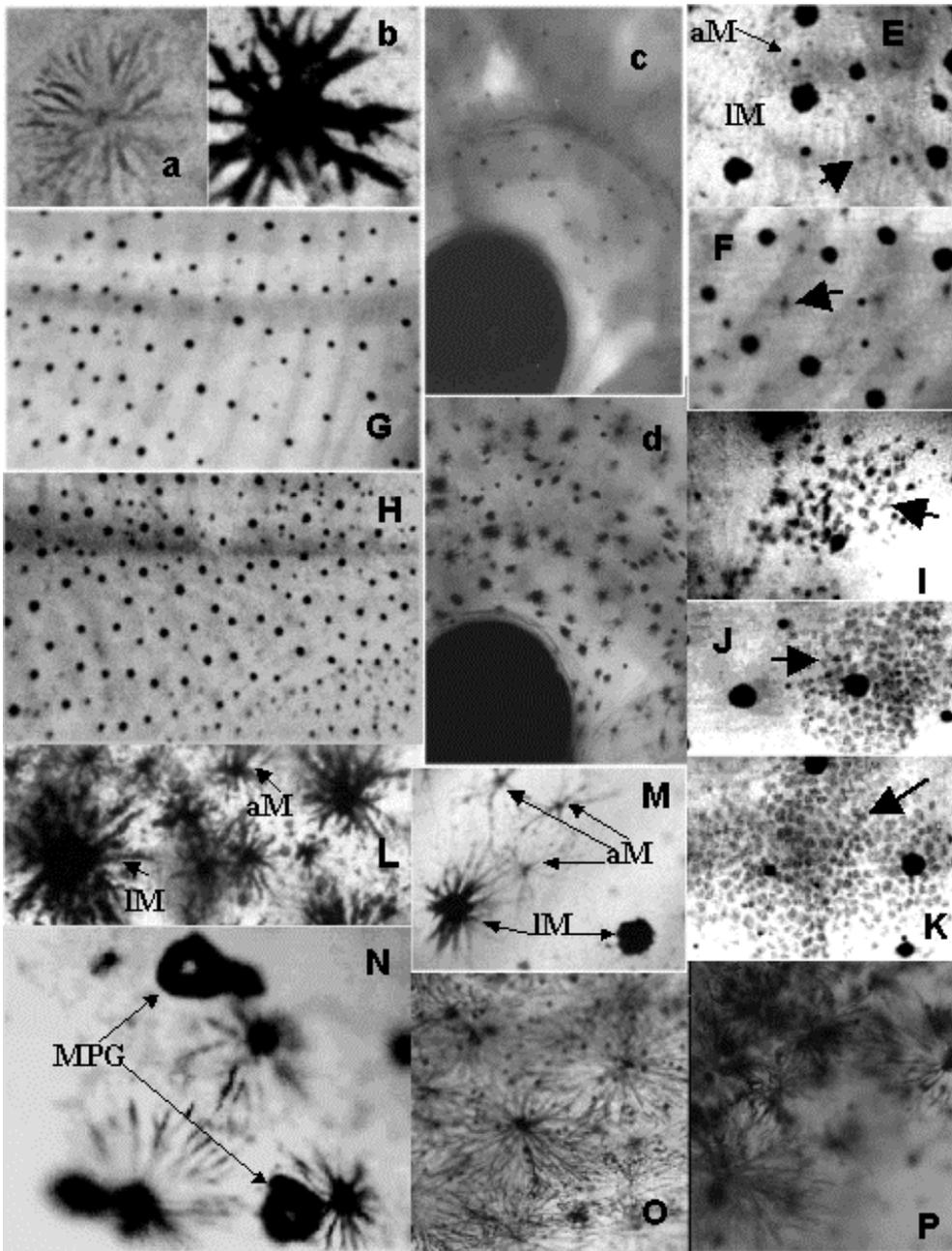


Рис. 2. Поверхностная дерма калкана: Различия в строении (а) - MZ1, (b) - BZ1- и распределении меланофоров в области глаз - (c) - MZ1, (d) - BZ1 - на 18 сут.

Группирование гуанофоров на левой стороне туловища: (E) - на 20 сут; (F) - 23 сут; (I) - 24 сут; (J) - 26 сут; (K) - 32 сут.

Различия в распределении меланофоров на туловищных миомерах на 26 сут: (G) - правой и (H) - левой стороны.

Личиночные (крупноклеточные) и взрослые (мелкоклеточные) меланофоров на 47 сут - (L) - в состоянии сильного возбуждения; (M) - в состоянии слабого возбуждения.

47 сут - (N) - меланофаги

Меланофоров в состоянии дисперсии у калкана в возрасте 60 сут: (O) - у группы MZ2, (P) - BZ2.

Условные обозначения: IM - личиночный меланофор; aM - взрослый меланофор; MPG - меланофаг; черная короткая стрелка - гуанофоры (Объяснения в тексте).

- взрослый меланофор; MPG - меланофаг; черная короткая стрелка - гуанофоры (Объяснения в тексте).

Fig. 2. Chromatophores of the surface derma of the Black Sea turbot: Differences in melanophores structure of MZ1 (a) and BZ1 groups (b) and melanophores distribution near the eyes of MZ1 (c) and BZ1 (d) groups at 18 dph. Guanofores aggregation process on the left side of the trunk: (E) - at 20 dph; (F) - 23 dph; (I) - 24 dph; (J) - 26 dph; (K) - 32 dph. Melanophore distribution at 26 dph on the middle trunk myomeres of the right (G) and left (H) side. Larval (large) and adult (small) melanophores at 47 dph: (L) - status of strong excitation; (M) - status of faint excitation. (N) - melanophage. Dispersed melanophores at 60 dph: (O) - MZ2 group, (P) - BZ2 group. Legend: IM - larval melanophore; aM - adult melanophore; MPG - melanophage; black short arrow - guanofores (Explanation in the text).

нным миомерам левой стороны составляет в среднем 4:1. Помимо МФР, на левой стороне в дерме локализуется множество ГФР (рис. 1В) и ЛФР (рис. 1Г). Диаметр МФР в состоянии контракции у кМФР больше, чем у мМФР, в 4 раза.

По мере взросления калкана происходит увеличение различий между правой и левой стороной туловища за счёт перераспределения хроматофоров: на левой стороне ГФР концентрируются в плотные скопления, поверх которых иногда присутствует 1 - 3 контрактированных мМФРа; вне зоны пятен ГФРов увеличивается количество мМФР. Диаметр ЛФР в состоянии контракции (рис. 1Е, красная стрелка) сопоставим по размеру с мМФРами (рис. 1Е, чёрная стрелка), а их плотность втрое меньше, чем мМФР.

На 35 сутки (SL = 15.0 - 15.5 мм), через две недели после разделения личинок на две группы с разным типом питания, VZ2 личинки характеризуются неравномерным чередованием разноразмерных МФР- и ГФР-ных пятен. Пятна ГФР у этой группы неправильной размытой, иногда эллипсовидной формы, их наибольший диаметр от 150 до 300 мкм. Практически все лучи дорсального плавника пигментированы МФР, в проходящем свете лучи имеют оранжевый оттенок. В области птеригофоров происходит чередование пятен МФР и ГФР. В хвостовой части туловища пятна МФР расположены линией под птеригофорами, под ними, над хордой - мелкие ГФР-ные пятна. От хвоста к голове вдоль хорды также наблюдается чередование неправильных пятен МФР и ГФР (7 к 6), а под хордой - в хвостовом отделе - 3 - 4 пятна ГФР чередуются с группами редких МФР. Вдоль птеригофорной зоны в анальном плавнике ГФР отсутствуют, а над брюшными птеригофорами находятся по 3 ГФРа.

У личинок MZ2 в возрасте 35 сут. наблюдается равномерное чередование МФР и ГФР по хорде от хвоста к голове. Диаметр пятен гуанофоров (более интенсивных по окраске, чем у VZ2 и имеющих форму почти пра-

вильного круга) в среднем 500 мкм. На левой стороне увеличивается количество мМФР. Правая сторона покрыта равномерно распределёнными точечными контрактированными МФР. Хорда личинок MZ2 практически свободна от МФР на протяжении начала хвостового отдела, над половиной брюшного отдела. По всему телу между МФР расположено большое количество ЛФР. Вдоль птеригофорных зон сгруппированы пятна МФР: 8 - вдоль спинных птеригофоров, 8 - вдоль анальных. Хвостовая часть не пигментирована, у основания находятся 2 овальных ГФР-ных пятна.

К 47 сут количество кМФР на левой стороне тела у обеих групп снижается, часто хорошо просматриваются чёрные крупные клетки неправильной расплывчатой формы, у которых отсутствуют как centrosoma, так и разветвления, предположительно, меланофаги (рис. 2N). При стрессе наиболее тёмную пигментацию создают именно диспергированные кМФР (рис. 1L), но скорость распространения возбуждения (движения меланиновых зерен) по дендритам мМФР (рис. 2M, aM) происходит быстрее по сравнению с кМФР (рис. 2M, bM).

На 54 - 60 сутки у калкана (SL = 17 - 25 мм) в поверхностной дерме правой стороны присутствуют только редкие контрактированные МФР и небольшое количество рассеянных ГФР, придающих этой стороне молочный оттенок. Левая сторона, напротив, окрашена в серый цвет, который достигается распределением в нижнем слое поверхностной дермы сгруппированных в пятна ГФР, в её поверхностном слое - множества мМФР. В состоянии контракции скопления мМФР занимают пространство между пятнами гуанофоров. Рассеянные мелкие ЛФР видны между МФРами в более глубоком слое поверхностной дермы. Цвет липофоров влияет на оттенок поверхностной дермы, и особенно заметен, когда МФР находятся в контрактированном состоянии.

В возрасте 60 суток у калкана группы MZ2 (рис. 1H) гуаниновые зерна в ГФРах

чёткой формы, распределены равномерно, и имеют ярко-голубой оттенок (рис. 1F) на светлом фоне дермы. Большие пятна (1 - 1.5 мм в диаметре) хорошо структурированных мелких МФР (рис. 2O) чередуются с пятнами ГФР (0.7 - 0.9 мм в диаметре); между ними расположено множество мелких ЛФР оранжевого и красного оттенков. У группы BZ2 в этом возрасте (рис. 1I) МФР заполняют пространство не только между ГФР, но и в их области, мелкие агрегированные МФР встречаются среди них реже, преобладают крупные грубо структурированные МФР (рис. 2P). Пятна ГФР небольшие и размытые, пластинки гуанина не оформлены четко и имеют фиолетово-красный оттенок (рис. 2G). Между ними просматриваются ЛФР преимущественно желтовато-оранжевого оттенка.

Различия, наблюдаемые на микроскопическом уровне, приводят к тому, что на макроуровне, визуальное, особи групп MZ2 и BZ2 в возрасте 60 сут легко различимы. Мальки MZ2 имеют тёмно-серый оттенок левой стороны и более ярко-молочный цвет правой стороны тела; мальки BZ2 характеризуются серовато-оранжевой пигментацией с левой и желтовато-белой с правой стороны.

Обсуждение. Развитие пигментного комплекса калкана от начала экзогенного питания до 60 сут характеризуется следующими закономерностями, независимыми от особенностей питания личинок. В конце эмбрионального периода и ранних личиночных этапов развития хроматофоры дифференцируются в поверхностной дерме обеих сторон тела, двусторонне симметрично. Хроматофорный комплекс в этот период развития состоит из крупных МФР (личиночного типа [9]) и ЛФР, находящихся в поверхностной дерме несколько ниже, от цвета и распределения которых зависит интенсивность окраски двусторонне-симметричных личинок. На ранних стадиях метаморфоза, в возрасте от 20 до 30 сут, начинает происходить асимметричное развитие хроматофоров в дерме левой и правой сторон тела.

На правой стороне тела расположены только крупноклеточные контрактированные МФР и небольшое количество ЛФР, появляются также редкие отдельные гуанофоры. На левой стороне, помимо крупных МФР и ЛФР, происходит дифференциация большого количества мелких МФР (взрослого типа [9]), плотность которых в поверхностной дерме возрастает по мере роста личинок. Одновременно в дерме левой стороны тела дифференцируются рассеянные ГФР, количество которых и степень агрегированности возрастают от 20 до 36 - 40 сут; они образуют круглые или овальные скопления, чередующиеся с группировками МФР. В промежуточном слое поверхностной дермы находятся равномерно распределённые ЛФР, которые формируют оттенок поверхностной дермы. С возрастанием плотности мелкоклеточных МФР на левой стороне, крупноклеточные МФР отмирают, а их остатки утилизируются меланофагами. В ходе метаморфоза на правой стороне редкие остаточные крупные МФР теряют способность к дисперсии, по-видимому, в результате разрушения структуры микротрубочек, а мелкоклеточные МФР (взрослого типа) не дифференцируются. Визуально создаётся эффект полного отсутствия МФР на слепой стороне тела. Правильное распространение мелкоклеточных МФР по всей поверхностной дерме левой стороны тела определяет правильную левостороннюю пигментацию камбалы.

Таким образом, в период завершения метаморфоза для правой стороны тела калкана характерно наличие редких остаточных крупноклеточных контрактированных меланофоров, для левой - большого количества мелкоклеточных меланофоров в состоянии дисперсии. В результате в возрасте 60 сут все особи калкана визуальное были нормально пигментированы, но при рассмотрении хроматофорного комплекса на микроскопическом уровне обнаружены значительные различия в структуре всех типов хроматофоров и их распределении, как в пред-, так и в метаморфозный период у групп калкана,

питавшихся в разных пищевых цепях (табл. 2).

Следовательно, характер пигментации калкана определяется структурой и пространственным распределением трёх основных классов хроматофоров. Различия в составе пищи личинок на любом этапе развития от начала

экзогенного питания до окончания метаморфоза оказывают влияние на структуру всего пигментного комплекса калкана. Различия в пигментных комплексах личинок калкана групп MZ1 и BZ1 в предметаморфозный период

Табл. 2 Характеристики пигментного комплекса камбалы калкана при различном питании

Table 2 Features of the Black Sea turbot pigment complex depending on diet

Характеристики пигментации (хроматофорного комплекса) калкана в возрасте 18 сут (15 сут после питания в разных пищевых цепях)	
Корм: копеподы (группа MZ1)	Корм: коловратки (группа BZ1)
Прозрачное светлое тело Серо-коричневый оттенок меланина Контрактированные МФР правильной округлой формы Диспергированные МФР тонко структурированы: центросома свободна от меланина; тонкие хорошо разветвленные (дендрические) отростки Зона хорды свободна от МФР Липофоры 2 типов: круглые жёлто-оранжевые и кирпично-красные звездчатые Распределение по миомерам МФР:ЛФР 1:1 регулярное	Желтовато-серое непрозрачное тело Чёрно-коричневый оттенок меланина Контрактированные МФР неправильной формы Диспергированные МФР грубо структурированы, без четкой центросомы; с грубыми, слабо разветвленными отростками МФР находятся в зоне хорды Липофоры 1 типа: жёлто-оранжевые неразветвленные МФР:ЛФР>3:1 распределены по миомерам хаотично
Характеристики пигментации (хроматофорного комплекса) калкана в возрасте 60 сут (>40 сут после питания в разных пищевых цепях)	
Корм: копеподы с 18 сут (группа MZ2)	Корм: артемии с 18 сут (группа BZ2)
Прозрачная дерма Серо-коричневый оттенок меланина Диспергированные МФР тонко структурированы Пластинки ГФРов голубые, четко округлые и распределены равномерно Большие округлые зоны МФР и ГФРов распределены гомогенно и дискретно	Непрозрачная дерма Чёрно-коричневый оттенок меланина Диспергированные МФР грубо структурированы Пластинки ГФРов фиолетовые, аморфные неравномерно распределенные Маленькие неправильной формы зоны МФР и ГФРов распределены гетерогенно и хаотично

развития заключаются в разном соотношении (плотности) липофоров и меланофоров, в составе и строении хроматофоров липофорного ряда (MZ1 - с преобладанием эритрофоров - звездчатых липофоров розовато-красных оттенков, BZ1 - с преобладанием ксантофоров - округлых липофоров без отростков желтоватых тонов), в структуре меланофоров (тонко организованной у MZ1 и грубо организованной у BZ1). Кроме того, в предметаморфозный период развития у личинок группы MZ1 липофоры и меланофоры распределены более равномерными рядами, соответствующими миомерам по обе стороны от зоны латеральной

линии и хорды, а у группы BZ1 хроматофоры распределены более хаотично и меланофоры заходят в область хорды.

К этим различиям у калкана групп MZ2 и BZ2 добавляются различия в цветности, форме, структуре, размерах и распределении меланофоров и гуанофоров. Группа MZ2 характеризуется более тонкой структурой меланофоров, ярким голубым оттенком гуанофоров, а также более крупными и четко оформленными скоплениями обоих классов хроматофоров. Для группы BZ2, напротив, характерны грубая структура меланофоров, аморфность гуанофоров и хаотичность их распределения в

скоплениях и чередовании самих скоплений.

Правильная пигментация формируется только в случае, если недифференцированные хроматобласты мигрируют в генетически предопределенные участки и дифференцируются в определенный класс хроматофоров и если в них образуется соответствующий данному хроматофору пигмент. Дифференциация хроматофоров из скопления клеток нервного гребня детерминирована по времени, и хроматофоры разных классов возникают в определенной последовательности. Непосредственно из клеток нервного гребня происходят меланобласты, из которых дифференцируются меланофоры - предшественники липофоров. У камбалообразных в процессе развития дифференциация хроматофоров из хроматобластов происходит дважды: первичная - в период, соответствующий последнему этапу эмбриогенеза; вторичная приурочена к началу метаморфоза [10]. Популяция первых - крупноклеточные меланофоры, называемые личиночными, вторых - мелкоклеточные меланофоры, называемые взрослыми. У калкана дифференциация популяции взрослых меланофоров начинается в возрасте 20 сут.

Пигменты, свойственные разным классам хроматофоров, существенно отличаются в химическом отношении и локализации в структуре клетки. Структуре меланофоров присуще наличие клеточных органелл, называемых меланосомами, на матриксе белковых нитей которых под контролем фермента тирозиназы из тирозина синтезируются полимеры хиноидной природы, меланины, устойчивые соединения, не растворимые ни в одном из полярных или неполярных растворителей, ни в кислотах, и связанные в МФРе с белком через сульфгидрильную группу цистеина. Индольные соединения меланина, реагируя с цистеином, могут модифицировать цвет меланофоров [2] от чёрных (МФР групп ВZ) до коричневых (МФР групп МZ) оттенков в результате изменения их светопоглощающих характеристик.

Цветность липофоров зависит от соотношения в них жёлтых и красных пигментов. В состав липофоров входят птерины, находящиеся в клеточных органеллах - птериносоммах, и каротиноиды, в свободном и этерифицированном (только высоконенасыщенными жирными кислотами) виде, находящиеся в каротиноидных пузырьках, локализованных либо непосредственно в цитоплазме, либо в цистернах эндоплазматического ретикулума. Птерины могут присутствовать как отдельно, так и в комбинации с каротиноидами, в одном и том же хроматофоре. Хроматофоры с преобладанием жёлтых пигментов относятся к ксантофорам; с преобладанием красных и оранжевых - к эритрофорам. В процессе онтогенеза рыб, в липофорах сначала синтезируются и становятся видимыми птерины. До начала активного питания, и, возможно, до окончательной резорбции желточного мешка, цветность липофоров у личинок определяется запасами каротиноидов желтка. После резорбции желточного мешка цветность ксантофоров и эритрофоров, дифференцируемых из них в процессе постэмбрионального развития, определяется эссенциальными каротиноидами, поступающими из экзогенных каротиноидов пищи практически в нетрансформируемом виде. Желтоватую окраску ксантофорам придают птерины и лютеин (ЛФР группы ВZ1), а красную эритрофорам - преимущественно астаксантин (ЛФР групп МZ). Интенсивность цвета ксантофоров и эритрофоров связана с изменением количества пигментов в самой клетке и с изменением формы самой клетки при участии цитоскелета, микротрубочки и микрофиламенты которого вызывают удлинение или сокращение цистерн эндоплазматического ретикулума, содержащих жир с растворёнными в нем каротиноидами [2].

Цветность гуанофоров обусловлена не собственно пигментами, а характером отражения падающего света от двойкопреломляющих кристаллов гипоксантина гуанина, содержа-

щихся в структуре данного хроматофора. Различия в цвете гуаниновых кристаллов в гуанофорах, их структуре и расположении у личинок групп MZ2 и BZ2, по-видимому, также связаны с различиями в химическом составе копепод и артемий как субстрате метаболизма. Оттенки гуанофоров определяются степенью интерференции света в пластинках кристаллов гуанина, зависящей от степени структуризации пластинок. Гуанофоры приобретают голубой оттенок (группа MZ2), если пластинки гуанина четко организованы в многослойные столбики и локализуются в перикарионе клетки, а при их беспорядочном распределении по цитоплазме цвет гуанофоров изменяется от желтоватого до фиолетового (группа BZ2) [5].

При питании личинок калкана морскими копеподами (MZ1 и MZ2) меланофоры характеризуются тонкой организацией: четко организованной центросомой, правильная округлая форма которой видна в состоянии контракции, и хорошо структурированным разветвленным цитоскелетом, хорошо различимым в состоянии дисперсии, т.е. при распространении меланосом по цитоскелету. Меланофоры личинок при питании не морским зоопланктоном (BZ1 и BZ2), напротив, преимущественно более грубой организации: их характеризуют неправильная форма центриоли, видной в состоянии контракции, грубая структура и слабая разветвленность цитоскелета, наблюдаемая в состоянии дисперсии. Нормой можно считать формирование хроматофоров при питании морскими копеподами, т.е. личинок групп MZ, в то время как отклонения от нормы в структуре и распределении хроматофоров у калкана происходят при питании не морским зоопланктоном, т.е. в группах BZ.

Внешняя форма меланофоров поддерживается поверхностной мембраной и обеспечивается клеточной адгезией их внешней оболочки к экстраклеточным матриксам окружающих клеток. Внутренняя структура поддерживается цитоскелетом, состоящим из ог-

ромного количества выходящих из центриоли цитоплазматических микротрубочек, по которым движется киноплазма с зёрнами пигмента меланина. Связки микротрубочек, бегущих параллельно длинным осям дендритов, поддерживают звёздообразную форму меланофоров. Центросома является регулирующим организатором цитоскелета [2]. Мы предполагаем, что при формировании хроматофорного комплекса у личинок BZ происходят нарушения в структуре меланофоров, как в строении центросомы и цитоскелета, так и характеристик экстраклеточного матрикса.

Очевидно, что отличия хроматофорного комплекса группы MZ от группы BZ связаны с различиями в (1) строении хроматофоров (меланофоров, липофоров, гуанофоров), связанных с характеристиками мембранных структур клеток, (2) дифференциации хроматофоров (эритрофоров, меланофоров, гуанофоров), (3) распределении (миграции) хроматофоров, (4) характеристиках межклеточной адгезии, и, несомненно, обусловлены неодинаковым составом незаменимых компонентов в кормовых объектах.

Различия в строении и распределении хроматофоров у экспериментальных групп калкана MZ и BZ нельзя относить за счёт содержания и соотношения в них ДГК и ЭПК, так как состав ВНЖК морского и солоноватоводного зоопланктона в наших экспериментах был сходен. Напротив, имеются значительные различия в аминокислотном и каротиноидном составе кормовых организмов MZ и BZ. Различия в составе незаменимых аминокислот могут влиять на оттенки меланина, модифицируемые в результате химических реакций его индольных компонентов с цистеином.

Морские копеподы содержат значительно большее количество каротиноидов, в составе которых доминирует астаксантин [9, 11], по сравнению с артемиями, в каротиноидном составе которых доминирует кантаксантин [8], а наименьшее количество каротиноидов,

преимущественно лютеин, содержат колловратки [собст. неопубл. данные]. Каротиноиды, незаменимые эссенциальные компоненты, которые не могут быть синтезированы личинками рыб, а только получены по пищевой цепи, играют неоднозначную и многофункциональную роль в процессе развития рыб, как на клеточном, так и на молекулярном уровнях. Они не только необходимы для синтеза витамина А, но и выполняют антиоксидантную функцию, участвуют в поддержании осмотического равновесия и гомеостаза клетки, регулируя проницаемость клеточных мембран и участвуя в кальциевом обмене [2]. Активная форма витамина А (ретиноидная кислота), в которую частично трансформируются каротиноиды, известна как важный морфоген, оказывающий плейотропное действие и влияющий на экспрессию генов, контролирующую формирование тканей на ранних пост-эмбриональных этапах развития [4, 8]. Степень агрегации пигментных гранул в эритрофорах, как и в меланофорах, в состоянии контракции хроматофоров, зависит от содержания свободного внутриклеточного кальция, связанного с каротиноидным обменом [4]. Состояние клеточных мембран зависит не только от правильного соотношения в них ВНЖК, но и от содержания в них каротиноидов.

Каротиноиды являются важными для органогенеза, особенно, на ранних этапах развития, предотвращают трансформации, индуцированные окислителями, поддерживают стабильность генома и резистентность организма к мутагенезу [2] и известны как активные морфогены [4]. В ряду каротиноидов «лютеин, кантаксантин, астаксантин» происходит увеличение жёсткой полиеновой структуры и снижение концентрации каротиноидов, необходимых для торможения перекисного окисления липидов. Астаксантин является самым эффективным антиоксидантом, обеспечивающим нормальные гомеостазис клетки, клеточную дифференциацию, контроль роста и нормальный морфогенез [2]. Таким образом, основной

каротиноид морских каланоидных копепод значительно эффективнее предохраняет все мембранные структуры клеток личинок калкана от воздействия свободных радикалов, а также более эффективно участвует в переносе кальция через мембраны, по сравнению с другими каротиноидами, лютеином или кантаксантином, характерными для колловраток или артемий. Степень адгезии клеток зависит от правильной организации структуры экстраклеточного матрикса клеток.

Питание личинок камбаловых артемией, совпадающее по времени с критическим периодом для детерминации правильной пигментации, сопровождается более низким содержанием в личинках ретинола (витамина А) и его производного - ретиналя, по сравнению с личинками, питающимися копеподами [8]. Кроме того, кантаксантин откладывается в тканях камбаловых в нетрансформированном виде. Очевидно, именно аккумуляция неконвертируемого кантаксантина в дерме калкана при питании артемией (группа ВZ) придает ей непрозрачный оранжеватый оттенок. Напротив, астаксантин вступает в комплексные соединения с белками, которые и придают прозрачный вид тканям питающихся копеподами личинок.

Из вышесказанного следует, что полученные нами различия в морфологии и распределении хроматофоров личинок групп МZ и ВZ, несомненно, связаны с различным каротиноидным составом в разных пищевых цепях. На ранних этапах развития личинок, каротиноиды практически без трансформации поступают при переваривании кормовых организмов, в их кровеносное русло и ткани. Различия в составе каротиноидов пищевой цепи, по видимому, влияет на дифференциацию хроматофоров. Мы предполагаем, что для правильной организации меланофоров (их морфологии и распределения в дерме) необходима дифференциация эритрофоров из ксантофоров. Дифференциация эритрофоров в ряду меланобласт - ксантофор - эритрофор может происходить

только при наличии астаксантина [2]. При отсутствии его в пище, происходит дифференциация каротиноид-содержащих липофоров иной структуры, которые могут создать иные адгезивные характеристики среды в структуре дермы, важные для локализации меланофоров, как личиночного, так и взрослого типа.

При формировании хроматофорного комплекса камбалы калкан, по-видимому, очень важно взаимодействие между меланофорами и липофорами. Правильная дифференциация липофоров необходима для обеспечения равномерного распределения меланофоров как результата их направленной миграции. Это предположение подтверждает наличие большого количества равномерно распределенных с меланофорами красных разветвленных липофоров (эритрофоров) и отсутствие меланофоров в области хорды и латеральной линии у личинок калкана на 18 сут при питании морскими copeподами. Взаимодействие между развитием ксантофоров и меланофоров обнаружено у мутантных вариаций *Danio rerio* [7]. Был найден ген *fms*, необходимый и для правильной дифференциации ксантофоров, и для регуляции апоптоза личиночных меланофоров, при формировании субпопуляции взрослых меланофоров и направленности их миграции в процессе создания пигментного комплекса взрослого типа. Изменение активности (экспрессии) гена *fms* на любом отрезке развития от эмбриона до окончания метаморфоза приводит к нарушениям в дифференциации липофоров и одновременно к нарушениям в «сборе» меланофоров; активизация этого гена на любой стадии развития приводит к дифференциации эритрофоров из ксантофоров и нормальному развитию и распределению меланофоров. Отсутствие незаменимых каротиноидов в пище приводит к задержке или нарушению нормальной дифференциации и миграции липофоров и, как следствие, к неправильному формированию хроматофорного комплекса в результате нарушения и изменения характеристик адгезивности всей совокупности хроматофоров и

их микросреды. Благоприятная микросреда для дифференциации и пролиферации меланофоров может создаваться только в присутствии эритрофоров с необходимыми адгезивными свойствами клеточных мембран. Известно, что наличие в близости латеральной линии определенной субстанции, влияющей на адгезивные свойства дермы, играет роль в распределении меланофоров в дерме рыб [7]. При нормальном развитии популяции липофоров определенные анти-адгезивные молекулы могут откладываться в области боковой линии, в середине туловища, что препятствует дифференциации и миграции в эту область меланобластов, из которых дифференцируются меланофоры, и в результате образуется свободная от меланофоров зона.

Выводы. 1. Пищевая цепь личинок калкана влияет на развитие всего пигментного комплекса, т.е. строения и распределения трёх основных классов хроматофоров, на всех этапах онтогенеза вплоть до завершения метаморфоза. По-видимому, соотношение специфических каротиноидов к содержанию ДГК/ЭПК в кормовых организмах, потребляемых камбалами на ранних стадиях развития, определяет характер дифференциации и миграции хроматофоров: меланофоров и ксантофоров до начала метаморфоза, и меланофоров и гуанофоров – на ранних этапах метаморфоза. Предполагается, что именно в результате дисбаланса специфических каротиноидов к ДГК/ЭПК могут происходить нарушения в развитии и миграции хроматофоров, которые приводят к изменениям в структуре и локализации хроматофоров. **2.** Различия в составе каротиноидов, поступающих из пищи, могут влиять на структуру ядра (центросомы) и формирование дендритов меланофоров, дифференциацию определенного типа липофоров, адгезивность среды в дерме для миграции и локализации в ней меланофоров, на дифференциацию меланофоров взрослого типа, а также

на структуру гуанофоров. Присутствие в пище неадекватного потребностям личинок калкана каротиноида артемий, кантаксантина, может вызывать также появление тератогенных метаболитов, приводящих к нарушениям структуры дермы и дифференциации хромофоров. Дисбаланс специфических каротиноидов и ДГК/ЭПК в пище калкана на ранних этапах развития может вызывать нарушения в развитии макроструктуры пигментации в результате нарушения структуры и локализации трёх классов хромофоров и адгезивности участков поверхностной дермы. **3.** Для определения функциональной роли отдельных незаменимых каротиноидов в дифференциации и миграции хромофоров необходимо произвести отдель-

ные экспериментальные исследования, сочетающие определение незаменимых каротиноидов в составе пищи и составе тела калкана с помощью хроматографических методов с параллельным исследованием формирования хромофоров в поверхностной дерме на ранних этапах его развития.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам ИнБЮМ Ткаченко Н.К., Данилюк О.Н., Белоиваненко Т.Г., участвовавшим в проведении экспериментов по выращиванию камбалы; Светличному Л.С. и Хворову С.А., помогавшим авторам в получении отдельных снимков (рис. 1 т, u, F, G), а также Нехорошеву М.Ю., Поспеловой Н.И. и Вяловой О.Ю., проводивших предварительные исследования каротиноидного состава пищи и личинок калкана.

1. Битюкова Ю.Е. Морфо-экологические особенности раннего онтогенеза черноморской камбалы калкана *Psetta maotica* (Pallas) в условиях искусственного выращивания: автореф. дисс.... канд. биол.наук. – М., 1986. – 24 с.
2. Микулин А.Е. Функциональное значение пигментов и пигментации в онтогенезе рыб. – М.: Изд-во ВНИРО, 2000. – 232 с.
3. Световидов А. Н. Рыбы Чёрного моря. Определители по фауне СССР, ЗИН АН СССР. – М.-Л.: Изд-во «Наука», 1964. – 551 с.
4. *Bagnara J. T.* The Pigmentary System // *Physiology and Pathophysiology.* Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J et al. (Eds.). – Oxford Univ. Press, Oxford, 1998. – P. 9 - 40.
5. *Cahu C., Zambonino Infante J., Takeuchi T.* Nutrients affecting quality in marine fish larval development morphogenesis in fish. // Larvi'01. Fish & Shellfish larviculture symposium. C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds.). – EAS Spec. Publ. – Oostende, Belgium, 2001. – **30**. – P.231 - 232.
6. *Fujii R., Hayashi H., Toyohara J.* et al. Analysis of the reflection of light from motile iridophores of the dark sleeper, *Odontobutis obscura obscura* // *Zool. Sci.* – 1991. – **8**. – P. 461 – 470.
7. *Khanaychenko A. N., Dhert P., van Ryckeghem K.* et al. Evaluations of fatty acid composition of live feed. // *Aquaculture and Water. Fish culture, shellfish culture and water usage: Abstracts of Intern. Conf. Aquaculture Europe'98* (Bordeaux, France, October 7-10, 1998). – EAS Spec. Publ. – Oostende, Belgium, 1998. – **26**. – P. 135 - 136.
8. *Parichy D. M.* Pigment patterns: fish in stripes and spots // *Curr. Biol.* – 2003. – **13**, No 24. – P. 947 - 950.
9. *Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen, Y.* Influence of lipid composition of live food on growth, survival and pigmentation of turbot larvae // *Aquac. Intern.* – 1994. – **2**. – P. 33 - 48.
10. *Rønnestad I, Helland S, Lie Ø.* Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods // *Aquaculture.* – 1998. – **165**, - No 1-2. – P. 159-164.
11. *Seikai T., Hirose E., Matsumoto J.* Dual appearances of pigment cells from in vitro cultured embryonic cells of japanese flounder: an implication for a differentiation-associated clock // *Pigm. Cell Res.* – 1993. – **6**. – No 6. – P. 423 - 431.
12. *van der Meeren T., Fyhn H. J.* Biochemical composition of copepods: seasonal variation in lagoon-grown zooplankton // Larvi'01. Fish and Shellfish Larviculture Symp. C. J. Hendry, G. van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds.). *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.* – Oostende, Belgium, 2001. – **30**. – P. 635 - 636.

Поступила 03 января 2007 г.

Особенности формирования хроматофорного комплекса камбалы калкан *Psetta maxima* var. *maeotica* в онтогенезе залежно від харчового ланцюга. А. М. Ханайченко, Ю. Є. Бітюкова. Порівняння впливу харчового ланцюга на розвиток пігментації (хроматофорного комплексу) у камбалі калкан *Psetta maxima* var. *maeotica* проводили протягом різних періодів розвитку: від початку екзогенного живлення до початку метаморфоза (3 - 18 діб) і від початку до останньої стадії метаморфоза (18 – 60 діб). Групи калкана (у двох повторах, з однакових партій ікри) годували або в типовому морському харчовому ланцюзі, що складається з культивуємих каланоїдних копепод *Acartia tonsa* (група MZ), або в штучному харчовому ланцюзі, що складається із солонуватоводних коловерток *Brachionus plicatilis* і метанаупліїв *Artemia franciscana* (група BZ). Для апроксимації жирнокислотного складу застосовували єдину схему насичення, у результаті якої у всіх кормових організмів були близькими значення змісту й співвідношення ДГК і ЕПК. Обидві групи калкана, MZ і BZ, були нормально пігментовані на макрорівні: симетрично до початку метаморфоза й асиметрично наприкінці метаморфоза - не пігментовані із правої й повністю пігментовані з лівої сторони. Розходження в хроматофорних комплексах груп MZ і BZ проявлялися на мікрорівні. До початку метаморфоза (18 діб) личинки групи MZ були пігментовані правильно розподіленими за міотомами розгалуженими червоними ліпофорами, що чергуються із сірими, добре розгалуженими меланофорами, утворюючи вільну від меланофорів зону уздовж латеральної лінії. Напроти, для групи BZ був характерний більше хаотичний розподіл темних чорних неправильно організованих меланофорів, що превалюють над жовтуватими-жовтогарячими нерозгалуженими ліпофорами, і відсутність вільної зони в латеральній лінії. Поділ на різні харчові ланцюги з початку метаморфоза приводило до розходжень у хроматофорних комплексах груп MZ і BZ за кольором, структурою й розподілом меланофорів, ліпофорів та, особливо, гуанофорів. Передбачається, що зміни в диференціації хроматофорів пов'язані з експресією *fms*-гену, що модифікується розходженнями в складі каротиноїдів харчових ланцюгів.

Ключові слова: калкан, харчовий ланцюг, пігментація, меланофор, ліпофор, гуанофор, диференціація

Patterns of chromatophore complex formation in ontogenesis of the Black Sea turbot, *Psetta maxima maeotica*, depending on the food web. A. N. Khanaychenko, Y. E. Bityukova. Comparison of the food web effect on development of pigmentation (chromatophore complex) in kalkan, the Black Sea turbot (BST), *Psetta maxima* var. *maeotica*, was carried out during different periods of development: from start of exogenous feeding till the onset of metamorphosis (3 - 18 dph) and from the onset till the last phase of metamorphosis (18 – 60 dph). Replicate groups of BST splitted from the same batches were fed either typical marine, consisted from cultured calanoid copepods *Acartia tonsa* (group MZ), or artificial food web consisted from brackish water rotifer *Brachionus plicatilis* followed by *Artemia* metanauplii (group BZ). To approximate fatty acid composition, all prey were enriched to obtain similar DHA and EPA contents and ratio. Both MZ and BZ groups, exhibited normal pigmentation on macro-level at the end of experimental periods: symmetrically pigmented before start of metamorphosis, and asymmetrically, unpigmented right and totally pigmented left side at the end of metamorphosis. Differences in chromatophores complexes of MZ and BZ were observed on micro-level. MZ group before start metamorphosis (18 dph) presented regular pigmentation patterns generated from alterations of dendritic red lipophores and grayish strictly organized highly dendritic melanophores, corresponding myotomes, with the zone free from melanophores in proximities of the lateral line. Alternative group BZ presented dark black mal-organized melanophores prevailing over presumably yellow-orange round lipophores distributed chaotically and not presenting melanophore-free zone near the lateral line. While splitting feeding during metamorphosis (18 - 60 dph), MZ and BZ chromatophore complex differed in colour hue, structure and distribution of melanophore, lipophore and, especially, guanophore pigment cells. Possible role of moderated by different food carotenoid composition *fms*-gene expression in chromatophore differentiation is not denied.

Key words: Black Sea turbot, food web, pigmentation, melanophore, lipophore, guanophore, differentiation