

УДК 594.124:591.134(2632.5)

Н. В. Караванцева, С. А. Щербань

**СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В
ГОНАДАХ, СПЕРМАТОЗОИДАХ И ЯЙЦЕКЛЕТКАХ
МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* В
УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО НЕРЕСТА И
ТЕМПЕРАТУРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

Изучены особенности белкового синтеза генеративной ткани мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Впервые определено содержание РНК и ДНК в половых продуктах самцов и самок и суммарное содержание нуклеиновых кислот в гонадах на разных стадиях репродуктивного цикла в условиях природного нереста и температурной стимуляции. Установлено, что к периоду нереста содержание нуклеиновых кислот в генеративных тканях мидий возрастает в среднем в три раза и не зависит от пола моллюсков. Отмечено, что суммарное количество ДНК в единице массы сухой ткани сперматозоидов в девять раз выше, чем яйцеклеток.

Ключевые слова: *Mytilus galloprovincialis*, белковый синтез, половые продукты, гонады, суммарная РНК, ДНК, нерест, репродуктивный цикл.

Сравнительно недавно мидия *Mytilus galloprovincialis* Lam. составляла значимую часть биоресурсов Черного моря. Однако в последние годы ее численность значительно снизилась, а добыча стала практически нецелесообразной [1]. Реальный способ увеличения биомассы мидий — это марикультура, основанная на сборе спата от естественно нерестящихся в море мидий на искусственные субстраты.

Особенности цикла размножения мидий позволяют создавать когорты производителей и изучать биохимический состав половых продуктов до оплодотворения и в процессе эмбриогенеза. Это особенно важно в комплексе с оценкой отдельных биохимических характеристик гонад в преднерестовый и нерестовый периоды, а также на стадии посленерестовой перестройки. Синтез белка в гонадах моллюсков, протекающий при непосредственном участии всех видов РНК, характеризует полноценность генеративной ткани. Данные о содержании нуклеиновых кислот в ней ограничены [5], относительно выметанных половых продуктов (ВПП) такая информация отсутствует.

© Н. В. Караванцева, С. А. Щербань, 2014

Цель работы — оценка особенностей репродуктивного биосинтеза у самцов и самок мидий в условиях природного нереста и при температурной стимуляции.

Материал и методика исследований. Объектом исследований были особи мидии *M. galloprovincialis* с длиной раковины $6,1 \pm 0,4$ см. Моллюсков (17 самок и 14 самцов) отбирали с капроновых коллекторов фермы бух. Ласпи (южный берег Крыма) на глубине 2 м в феврале и апреле 2009 г. Пол и стадию зрелости гонад определяли по 6-балльной шкале на мазке гонад с помощью микроскопа МБИ-6 [1, 6]. Животных очищали от оброста и помещали в холодильник на 1,5 ч, после чего рассаживали отдельно по стаканам емкостью 0,5 л и заливали 300 мл профильтрованной морской воды ($18 \pm 1^\circ\text{C}$). Для получения половых продуктов в лабораторных условиях нерест моллюсков стимулировали по методике [9, 10] резким повышением температуры морской воды на $7\text{—}9^\circ\text{C}$. У самцов нерест начинался через 15 мин, у самок — через 30—45 мин. Продолжительность нереста составляла 4—6 ч. Каждую пробу просматривали под микроскопом на однородность состава половых продуктов для исключения гермафродитных особей. Сбор яйцеклеток и сперматозоидов проводили по методике [2]. У отнерестившихся мидий брали навески гонад. Для биохимических исследований каждую пробу (суспензированные сперматозоиды, яйцеклетки и гонады после нереста) фиксировали раствором Фолча.

Интенсивность синтеза белка оценивали по содержанию суммарного количества РНК и расчетному индексу РНК/ДНК. Количественное определение нуклеиновых кислот проводили спектрофотометрически [5] и выражали в $\text{мкг}\cdot\text{мг}^{-1}$ сухой ткани. Статистическую обработку осуществляли в программе Excel: рассчитывали среднее арифметическое значение (M), ошибку средней (m), среднее квадратичное отклонение (σ) и коэффициент вариации (CV). Схема получения исходного материала для биохимического анализа представлена на рисунке. В работе использованы опубликованные материалы по исследуемым параметрам в преднерестовых гонадах и в гонадах, находящихся на стадии нереста и резорбции (весенний период) [7].

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что гонады самцов и самок 5-й стадии (после нереста, полученного в результате температурной стимуляции) и ВПП различаются интенсивностью репродуктивного биосинтеза: в гонадах самцов и самок после нереста она была соответственно в 11,6 и 1,5 раза выше, чем в ВПП. Индекс «мгновенной» скорости роста РНК/ДНК, часто используемый как показатель анаболической активности [4, 9, 11], в гонадах самцов был значительно выше, чем у самок (табл. 1). Содержание суммарных РНК также было выше у самцов (в 2,1 раза).

ВПП самцов характеризовались максимально высокими показателями содержания ДНК ($3,39 \pm 0,33 \text{ мкг}\cdot\text{мг}^{-1}$) — в 8,9 раза выше, чем у самок. Средняя индивидуальная вариабельность этого показателя для выборки самцов составляла 27,8, самок — 25,6. В то же время суммарное содержание

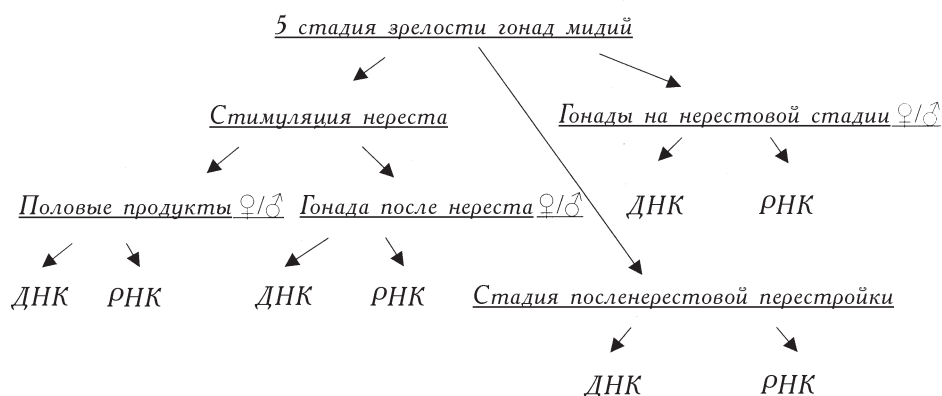


Схема отбора проб.

1. Содержание суммарных РНК, ДНК (мкг·мг⁻¹ сухой ткани) и значение РНК/ДНК в гонадах и выметанных половых продуктах (ВПП) мидий и после стимуляции нереста (апрель 2009 г.)

Мидии	РНК		ДНК		РНК/ДНК	
	ВПП	гонады	ВПП	гонады	ВПП	гонады
Самцы	0,84 ± 0,06	11,70 ± 2,07	3,39 ± 0,33	0,36 ± 0,07	0,25 ± 0,02	36,13 ± 6,58
Самки	2,61 ± 0,10	5,45 ± 0,55	0,37 ± 0,03	0,94 ± 0,19	7,05 ± 0,60	5,48 ± 0,99

РНК в сперматозоидах ($0,84 \pm 0,06$ мкг·мг⁻¹) было втрое ниже, чем в яйцеклетках.

Известно, что на момент нереста гонады имеют максимальную сухую массу, общее содержание белка в них может достигать 60% [6]. Ранее было показано, что содержание нуклеиновых кислот заметно возрастает по мере созревания гонад (от 1-й до 4-й стадии), достигая максимальных значений на 5-й, и отражает интенсивность синтеза белка [7]. Содержание суммарных РНК в гонадах самцов 3—4-й стадии зрелости в 1,9 раза ниже, чем в гонадах самцов, готовых к нересту, у самок эти различия составляют 2,1 раза (табл. 2).

Достаточно высокая изменчивость исследованного показателя на 5-й стадии в условиях природного нереста связана, по-видимому, с его различной интенсивностью у каждой особи (порционность вымета, длительность нереста около 30 дней), уровень белкового анаболизма становится зависимым от физиологического состояния организма. После нереста наступают процессы резорбции и последующей регенерации половых клеток. Содержание суммарных РНК в гонадах самок на стадии резорбции клеток в условиях природного и после температурно-стимулированного нереста не раз-

2. Содержание суммарных РНК (мкг·мг⁻¹) в гонадах и половых продуктах мидий *M. galloprovincialis*

Стадии зрелости мидий	Самки		Самцы	
	$M \pm m$	CV	$M \pm m$	CV
3—4-я (преднерестовая)	6,92 ± 0,70	37,7	7,94 ± 0,25	10,6
4—5-я (стимуляция)	5,45 ± 0,55	20,3	11,70 ± 2,07	39,5
5 (стадия нереста)	15,01 ± 1,27	29,4	15,60 ± 2,04	41,0
6-я (стадия резорбции)	5,50 ± 0,30	8,1	—	—
ВПП	8,27 ± 1,12	40,8	0,84 ± 0,06	18,9

3. Содержание суммарных ДНК (мкг·мг⁻¹) в гонадах и половых продуктах мидий *M. galloprovincialis*

Стадии зрелости мидий	Самки		Самцы	
	$M \pm m$	CV	$M \pm m$	CV
3—4-я (преднерестовая)	0,45 ± 0,06	< 10	0,51 ± 0,06	< 10
4—5-я (стимуляция)	0,94 ± 0,19	49,6	0,36 ± 0,07	43,9
5-я (стадия нереста)	1,40 ± 0,22	5,4	1,70 ± 0,57	8,8
6-я (стадия резорбции)	0,35 ± 0,07	31,8	—	—
ВПП	0,38 ± 0,03	25,6	3,39 ± 0,33	27,8

личалось и составляло соответственно $5,50 \pm 0,30$ и $5,45 \pm 0,55$ мкг·мг⁻¹ ($p > 0,02$). Самцов на данной стадии не исследовали.

Содержание ДНК в гонадах самцов и самок, не подвергавшихся температурной стимуляции, на 5-й стадии статистически не различалось и было равно соответственно $1,40 \pm 0,08$ и $1,70 \pm 0,10$ мкг·мг⁻¹ при низких CV — соответственно 5,4 и 8,8 (табл. 3). В гонадах мидий, подвергавшихся температурной стимуляции, эти значения различались более чем вдвое.

Можно предположить, что гонады моллюсков, проходящих стадию резорбции половых клеток в результате длительного порционного выброса гамет, оказываются более опустошенными и, как следствие, содержат небольшое количество единичных половых клеток и сопутствующих амебоцитов. Содержание ДНК в таких гонадах низкое (см. табл. 3). Количество ДНК в ВПП самцов в среднем в девять раз выше, чем у самок, что объясняется значительно меньшими размерами сперматозоидов и их большей численностью в объеме гонады.

Заключение

Таким образом, интенсивность репродуктивного белкового синтеза у мидий в гонадах 3—4-й, 4—5-й стадий зрелости, подвергавшихся температурной стимуляции и на стадии резорбции различается. При этом отмечена достаточно высоко-

кая вариабельность величин внутри выборок. В гонадах, подвергавшихся стимуляции, интенсивность белкового синтеза у самцов в 2,1 раза выше, чем у самок, а в условиях природного нереста она одинаковая. Индекс РНК/ДНК в сперматозоидах в 88 раз ниже, чем в яйцеклетках, в гонадах у самцов после нереста он в 6,6 раза выше, чем у самок. В условиях природного нереста активность синтеза белка увеличивается по мере созревания гонад и не различается у обоих полов.

Оплодотворяющая способность самцов, оцениваемая количественно по содержанию ДНК в ВПП, характеризует качество спермиев и предполагаемый объем личиночного материала. Содержание ДНК в ВПП самцов ($3,39 \pm 0,33$ мкг·мг⁻¹) в 8,9 раза выше, чем у самок, что объясняется разными размерами половых клеток. Предположительно, в процессе оплодотворения в природных условиях на одну яйцеклетку приходится девять сперматозоидов.

**

*Вивчено особливості синтезу білка в генеративних тканинах мідії *Mytilus galloprovincialis* Lam. Вперше встановлено вміст РНК і ДНК у статевих продуктах і гонадах самців і самиць на різних стадіях репродуктивного циклу в умовах природного нересту і температурної стимуляції. Показано, що до початку нересту вміст нуклеїнових кислот в генеративних тканинах мідій зростає у середньому втричі і не залежить від статі молюсків. Встановлено, що сумарний вміст ДНК в сперматозоїдах у дев'ять разів вищий, ніж в яйцеклітинах.*

**

*Peculiarities of protein synthesis in generative tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. were investigated. For the first time the RNA and DNA content in sex products of male and female of mussels has been determined. The data on the total nucleic acid content in the mollusks' gonads during various stages of their reproductive cycle under conditions of natural spawning and thermal stimulation were given. By the time of spawning the nucleic acid content in the mussel generative tissues increases up to 3 times and does not depend on mollusk sex. It is noted that the total amount of DNA in sperm is 9 times higher than in eggs.*

**

1. *Марикультура мидий на Черном море / Под ред. В. Н. Иванова. — Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. — 314 с.*
2. *Караванцева Н. В., Поспелова Н. В., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Методика отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Системы контроля окружающей среды. — Севастополь: МГИ НАН Украины, 2012. — Вып. 17. — С. 184—187.*
3. *Петкевич Н. С., Вялова О. Ю. О вариабельности морфологических и биохимических характеристик у черноморских мидий // Наук. зап. Терноп. пед. ун-та. Сер. Біологія. — 2005. — № 4 (27). — С. 174—176.*
4. *Солдатов А. А., Бочко О. Ю., Головина И. В., Щербань С. А. Биохимические эффекты полихлорированных бифенилов на организм черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Мор. экол. журн. — 2005. — № 1. — С. 105—112.*

5. Спири́н А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958.— Т. 23, № 5. — С. 656—662.
6. Финенко Г. А., Романова З. А., Аболмасова Г. И. Экологическая энергетика черноморских мидий // Биоэнергетика гидробионтов. — Киев: Наук. думка, 1990. — С. 32—37.
7. Щербань С. А., Вялова Ю. В. Половые и фенотипические особенности содержания РНК в гонадах черноморских мидий // Доп. НАН України. — 2008. — № 2. — С. 166—170.
8. Bowen K. L., Johannsson O. E., Smith R., Schlechtriem C. RNA/DNA and protein indices in evaluating growth and condition of aquatic organisms: a review // Ann. Conf. Great Lakes Res. — 2005. — Vol. 48. — P. 34—39.
9. Newel R., Thompson R. Reduced clearance rates associated with spawning in the mussel, *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia, Mytilidae) // Mar. Biol. Lett. — 1984. — Vol. 5, N 1. — P. 21—23.
10. Pennec M. Les methodes experimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins // Haliotis. — 1981. — Vol. 11. — P. 139—155.
11. Rooker J. R., Holt G. J. Application of RNA/DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciachops ocellatus*) // Mar. Freshwat. Res. — 1996. — Vol. 47, N 2. — P.12—18.

Институт биологии южных морей
НАН Украины, Севастополь

Поступила 24.04.14