

УДК 595.123.1:591.463.11

## УЛЬТРАСТРУКТУРА СПЕРМАТОЗОИДОВ БЕСКИШЕЧНОЙ ТУРБЕЛЛЯРИИ *ARCHAPHANOSTOMA AGILE* (ASCOELA)

Я.И. Заботин, А.И. Голубев

### Аннотация

Ультраструктура сперматозоидов широко используется в систематике бескишечных турбеллярий (Acoela). Филогенетические построения могут стать ближе к истине, если данные по этому вопросу будут известны для большего числа видов. В настоящей работе приводятся данные по тонкому строению сперматозоидов бескишечной турбеллярии *Archaphanostoma agile*. Были выявлены две характерные морфологические особенности, не отмеченные ранее у других видов Acoela. Первая касается строения хвостового отдела. По всей его длине между аксонемами жгутиков проходит пара электроннопрозрачных тяжей в виде узких лент. Вторая особенность заключается в необычном строении аксонем жгутиков. В центре аксонемы помимо двух «классических» непарных микротрубочек обнаружены еще две овальные структуры меньшего диаметра, что позволяет обозначить ее строение нестандартной формулой  $9 + 4$ . Специфические особенности сперматозоидов *A. agile* позволяют сделать вывод о большем разнообразии ультраструктурных признаков организации Acoela, чем предполагалось ранее.

**Ключевые слова:** бескишечные турбеллярии (Acoela), половая система, сперматозоиды, ультраструктура.

### Введение

Ультраструктура сперматозоидов широко используется в систематике как ресничных червей в целом [1–5], так и бескишечных турбеллярий (Acoela) в частности [6–11].

Сперматозоиды Acoela характеризуются рядом особенностей. Они имеют нитевидную или лентовидную форму и состоят из трех отделов: проксимальной части (с удлинённым ядром), промежуточной части (с митохондриями и другими органеллами) и дистального отдела, снабженного двумя жгутиками. На ультраструктурном уровне сперматозоиды Acoela могут очень сильно отличаться по ряду признаков: в основном по составу и расположению аксонем в жгутиках и свободных аксонем в цитоплазме спермия. У большинства видов Acoela аксонемы спермиев построены по обычной схеме, характерной для ресничек и жгутиков: девять парных микротрубочек (дублетов) по периферии аксонемы и две непарных (синглета) в центре ( $9 + 2$ ). Однако в пределах этой группы описаны еще два варианта организации аксонем. В этих случаях редуцируется либо одна из центральных микротрубочек ( $9 + 1$ ), либо обе ( $9 + 0$ ). Цитоплазматические микротрубочки могут располагаться в кортикальной области клетки параллельно продольной оси спермия (кортикальные микротрубочки) или ближе к центру клетки (аксиальные микротрубочки) [5–7, 10].

В последнее время особенности ультраструктуры сперматозоидов (формула аксонем жгутиков, расположение цитоплазматических микротрубочек) все чаще используются при реконструкции филогенетических отношений внутри таксона Acoela. Эти построения могли бы быть ближе к истине, если бы морфология аксонем бескишечных турбеллярий была известна для большего числа видов. Данная работа посвящена изучению ультраструктуры сперматозоидов бескишечной турбеллярии *Archaphanostoma agile* (Jensen, 1878) с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

*Archaphanostoma agile* относится к семейству Isodiametridae Hooge & Tyler, 2005 (ранее этот вид причислялся к семейству Convolutidae Graff, 1905). Этот вид встречается в верхнем слое грунта, богатом детритом, и на водорослях, и распространен в Северной Атлантике, в наших северных морях (Баренцевом и Белом) и в Средиземном море [12, 13]. Половая система *A. agile* состоит из парных вентральных яичников с передней зачатковой зоной и парных дорсальных семенников, расположенных в передней части тела. Женские совокупительные органы представлены паренхимной бурсой (без эпителиальной выстилки и наконечника), а мужские – выворачивающимся копулятивным органом – циррусом. Женское половое отверстие отсутствует [12, 13]. На светооптическом уровне половая система *A. agile* изучена довольно полно.

### 1. Материалы и методы

Представители вида *Archaphanostoma agile* были собраны в июне 2007 г. на литорали о-ва Виченная Луда (губа Чупа, Керетский архипелаг, Белое море) в грунте и смывах с водорослей. Черви были зафиксированы целиком в 1%-ном глютаровом альдегиде на 0.1 М фосфатном буфере.

Материал обрабатывался для трансмиссионной электронной микроскопии по стандартной схеме – дополнительная фиксация 1%-ным раствором четырехокси осмия на 0.1 М фосфатном буфере, обезвоживание спиртовым рядом (от 30% до абсолютного) и ацетоном, заливка в эпоновую смолу.

Ультратонкие срезы были получены с помощью ультрамикротомы «Reichert-Jung», контрастированы уранил-ацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование срезов осуществлялись с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 7.

### 2. Результаты

Как показали измерения, зрелый сперматозоид *A. agile* имеет длину 5–6 мкм (без «хвостовой» части). Как и сперматозоиды других Acoela, он состоит из трех частей (рис. 1). Передний (проксимальный) отдел – «головка» длиной 4 мкм и диаметром 0.3 мкм с длинным вытянутым электронноплотным ядром, занимающим все ее пространство. Другие структуры в переднем отделе не были обнаружены. Средний отдел – относительно короткая «шейка» длиной 1–1.5 мкм и диаметром 0.5–0.7 мкм, в которую заходит дистальный конец ядра (рис. 2). Этот отдел содержит крупные митохондрии (до 0.25 мкм в диаметре) и более мелкие электронноплотные гранулы (диаметром 0.1 мкм). В этом же отделе присутствуют и проксимальные участки аксонем (диаметром около 0.25 мкм)

двух жгутиков. Аксонемы проходят по всей длине третьего, дистального или «хвостового» отдела. Наружная поверхность сперматозоида не является гладкой и кажется покрытой мелкими электронноплотными бугорками (рис. 3).

Обращают на себя внимание две особенности ультратонкого строения сперматозоида *A. agile*, не отмеченные ранее у других бескишечных турбеллярий.

Первая касается строения «хвостового» отдела. По всей его длине между аксонемами жгутиков проходит пара мембраноограниченных электроннопрозрачных тяжей. На поперечном срезе каждый из них имеет вид узкой ленты шириной около 0.25 мкм, ограниченной с двух сторон электронноплотными гранулами (рис. 4).

Вторая особенность заключается в необычном строении аксонем жгутиков. Общее число периферических дублетов микротрубочек равно 9. Дублеты имеют хорошо заметные «ручки», изогнутые навстречу друг другу, так что в некоторых случаях даже создается обманчивое впечатление присутствия третьей микротрубочки. Весьма неожиданным оказалось то, что в центральной части аксонемы, помимо двух «классических» непарных микротрубочек, присутствуют еще две структуры меньшего диаметра, также напоминающие микротрубочки (рис. 5). И в этом случае для обозначения строения аксонемы жгутика *A. agile*, скорее всего, напрашивается формула  $9 + 4$ . Такое строение центральной области аксонемы было обнаружено во всех исследованных сперматозоидах, что позволяет исключить возможность артефакта или случайной аберрации.

Цитоплазматические микротрубочки, характерные для мужских гамет *Acoela* (см. [5, 7, 10]), располагаются по периферии сперматозоида, непосредственно вдоль всей внутренней поверхности мембраны, за исключением участков, где располагаются аксонемы жгутиков. Такие микротрубочки получили название кортикальных.

Среди клеток паренхимы *A. agile* обнаружены сперматозоиды на разных стадиях созревания. Молодые сперматоциты имеют круглую или овальную форму и достигают 5 мкм в диаметре. Наиболее заметными органеллами их цитоплазмы являются каналы ЭПС и диктиосомы комплекса Гольджи. Митохондрии в сперматоцитах крупнее, чем в сперматозоидах – до 0.5 мкм в диаметре, но число их заметно меньше. Много здесь электронноплотных гранул и лизосом. Встречаются и овальные образования диаметром 1 мкм с характерным наполнением из мультиламеллярных телец и вакуолей различного диаметра (рис. 1, 7, 8).

Более зрелые сперматоциты имеют вытянутую форму и достигают 10 мкм в длину и 3 мкм в ширину (рис. 6). Вытянутое ядро (длиной 6–7 мкм) характеризуется большим количеством хроматина неодинаковой электронной плотности. Вокруг него разбросаны митохондрии и электронноплотные гранулы. На дистальном конце клетки, к которому смещено ядро, просматриваются основания аксонем двух жгутиков. В ходе сперматогенеза клетка вытягивается, ядро перемещается в проксимальную область будущего сперматозоида, кинетосомы жгутиков остаются на противоположном (дистальном) конце, а сами жгутики погружаются в сперматиду, так что кончики их оказываются возле ядра – в «шейке» формирующегося сперматозоида. Такое положение жгутиков называется инвертированным (см. [1, 5]).

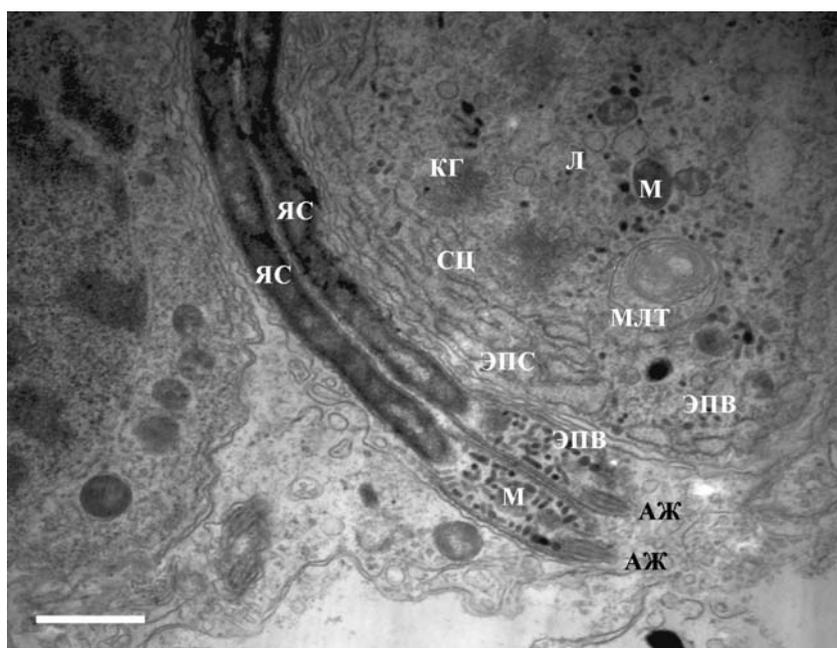


Рис. 1. Два зрелых сперматозоида в продольном разрезе. Справа развивающийся сперматоцит. ЯС – ядро сперматозоида, М – митохондрии, КГ – комплекс Гольджи, ЭПС – эндоплазматическая сеть, ЭПВ – электронноплотные включения, Л – лизосомы, МЛТ – мультиламеллярное тело, АЖ – аксонемы жгутиков, СЦ – сперматоцит. Масштаб: 1 мкм

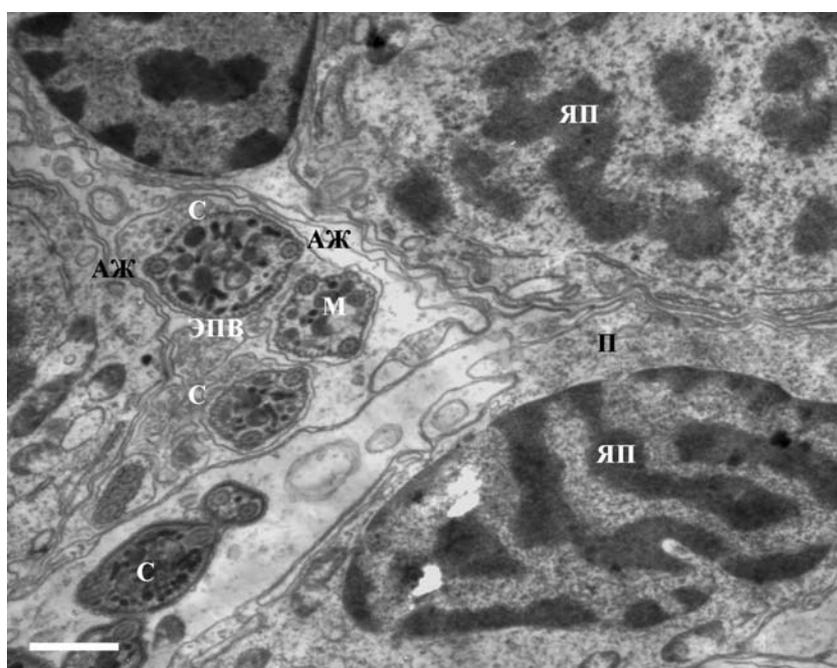


Рис. 2. Зрелые сперматозоиды среди клеток паренхимы. С – сперматозоиды, М – митохондрии, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксонемы жгутиков, П – клетки паренхимы, ЯП – ядра клеток паренхимы. Масштаб: 1 мкм

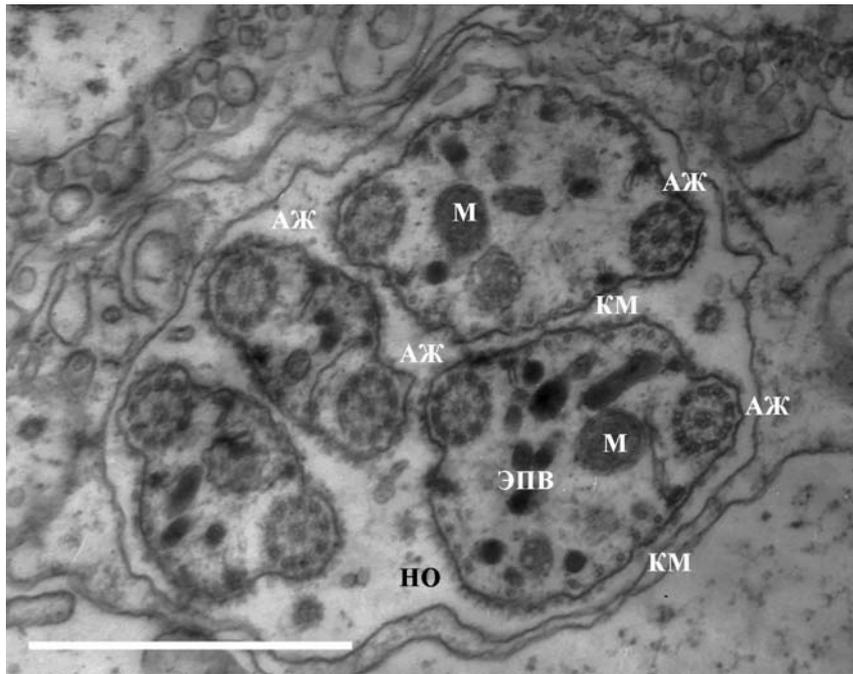


Рис. 3. Четыре зрелых сперматозоида на поперечном срезе (в средней части). М – митохондрии, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксонемы жгутиков, КМ – кортикальные микротрубочки, НО – наружная орнаментация. Масштаб: 1 мкм

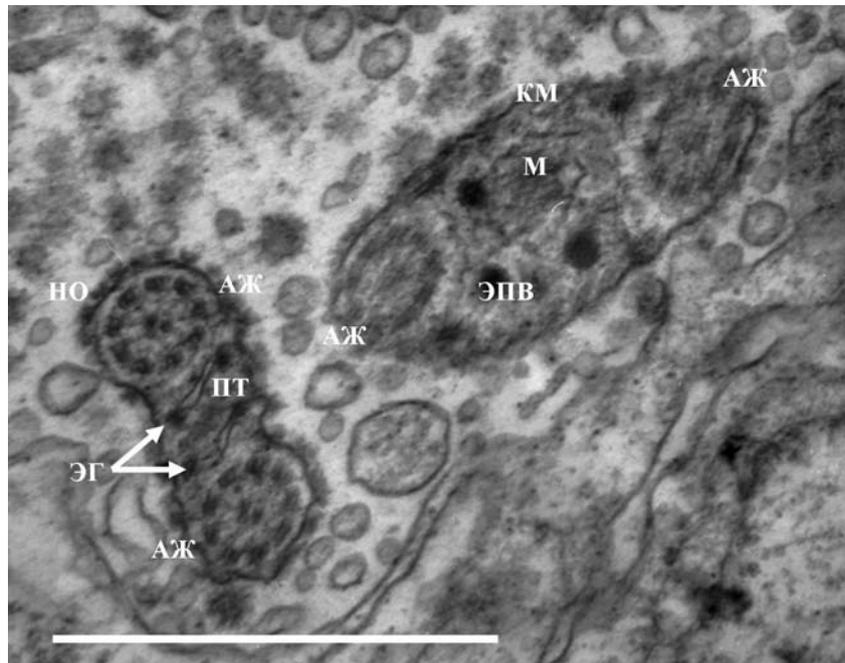


Рис. 4. Два зрелых сперматозоида на поперечном срезе (правый – в средней части, левый – в хвостовой). М – митохондрии, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксонемы жгутиков, КМ – кортикальные микротрубочки, ПТ – продольные тяжи, ЭЦ – электронноплотные гранулы, НО – наружная орнаментация. Масштаб: 1 мкм

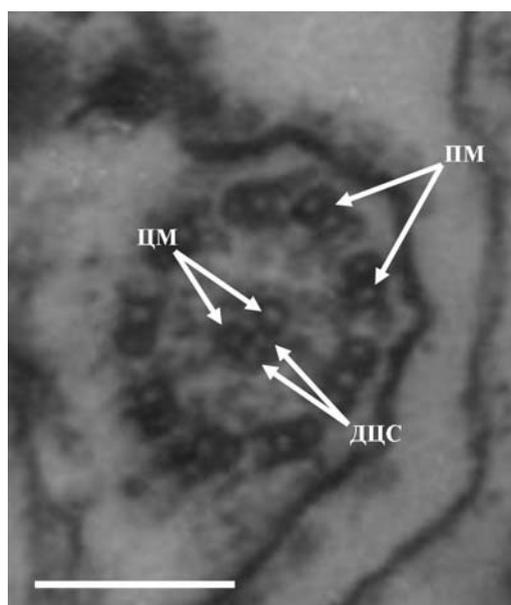


Рис. 5. Аксонома жгутика сперматозоида. ПМ – периферические микротрубочки, ЦМ – центральные микротрубочки, ДЦС – дополнительная центральная структура. Масштаб: 0.25 мкм

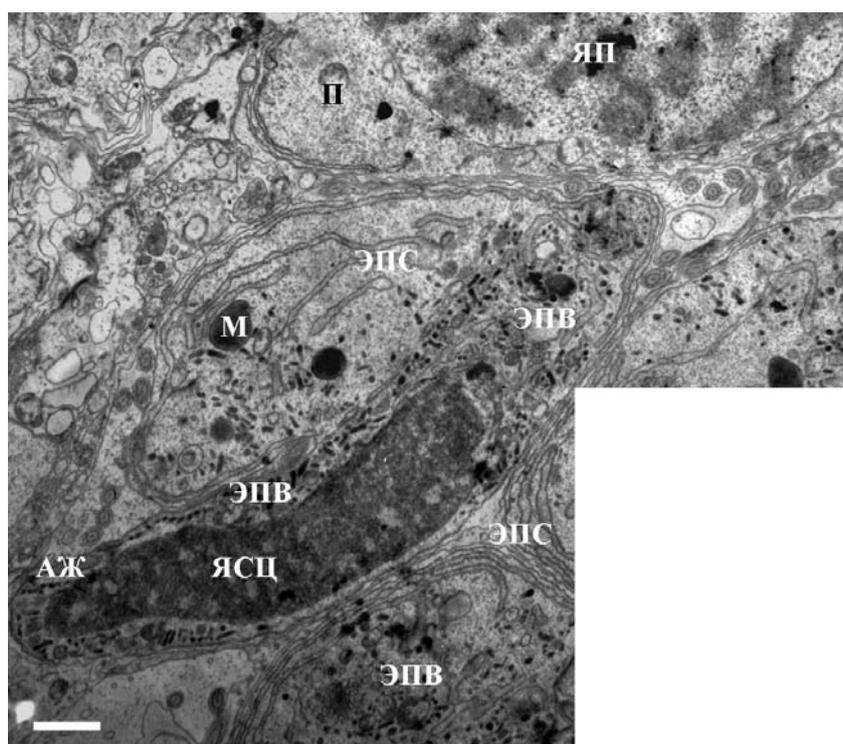


Рис. 6. Созревающий сперматоцит на продольном срезе. ЯСЦ – ядро сперматоцита, М – митохондрии, ЭПС – эндоплазматическая сеть, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксономы жгутиков, П – клетки паренхимы, ЯП – ядра клеток паренхимы. Масштаб: 1 мкм

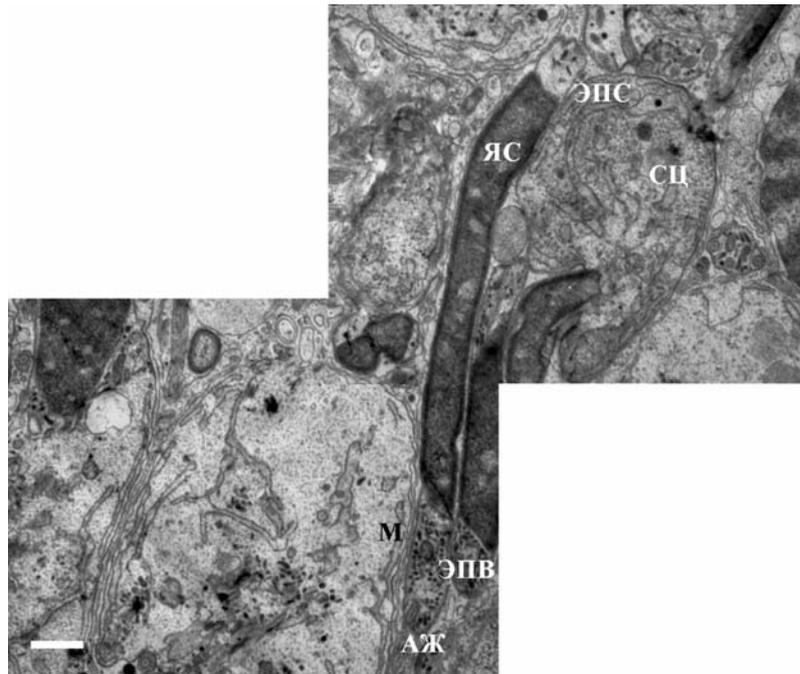


Рис. 7. Два созревающих сперматозоида и сперматоцит. ЯС – ядро сперматозоида, М – митохондрии, ЭПС – эндоплазматическая сеть, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксоны жгутиков, СЦ – сперматоцит. Масштаб: 1 мкм

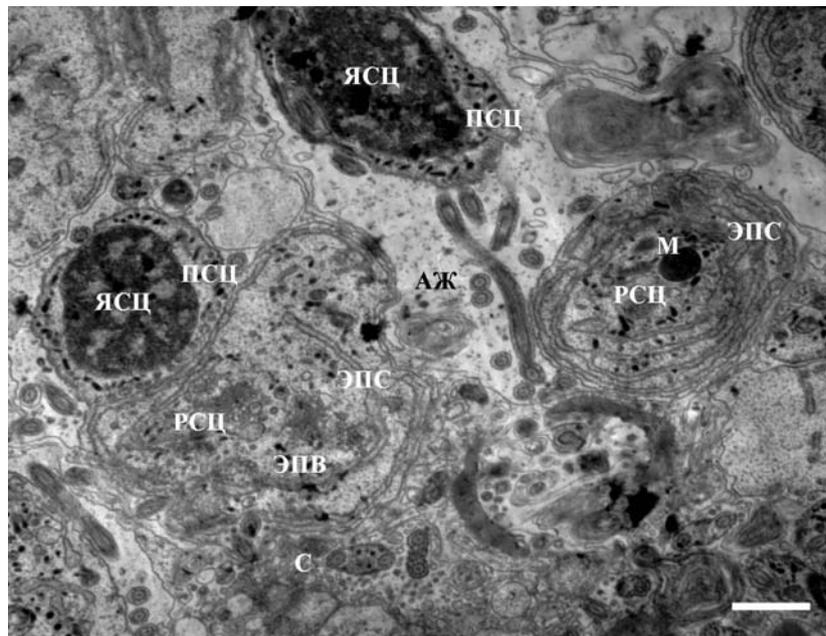


Рис. 8. Сперматоциты на разных стадиях созревания и два зрелых сперматозоида на поперечном срезе (внизу). С – сперматозоиды, РСЦ – ранний сперматоцит, ПСЦ – поздний сперматоцит, ЯСЦ – ядро сперматоцита, ЭПС – эндоплазматическая сеть, М – митохондрии, ЭПВ – электронноплотные включения, АЖ – аксоны жгутиков. Масштаб: 1 мкм

### 3. Обсуждение

У разных видов Acoela как ультраструктура зрелых сперматозоидов, так и сам процесс их формирования могут существенно отличаться [1, 5]. В целом сперматогенез *Archaphanostoma agile* сходен с таковым у других Acoela и большинства турбеллярий [6]. Однако в литературе имеются данные, что у некоторых видов Acoela (например, у *Actinoposthia beklemishevi*) формируются сперматозоиды с неинвертированными аксонемами жгутиков. При таком ходе сперматогенеза жгутики поворачиваются на  $180^\circ$ , но ядро остается в дистальной части клетки. Таким образом, рядом с ядром оказываются основания жгутиков, а не их окончания [5, 6].

Строение сперматозоидов *A. agile* впервые было описано О.И. Райковой [6]. По ее данным, цитоплазматические микротрубочки занимают кортикальное положение, а аксонема имеет типичную формулу  $9 + 2$ .

Ультраструктура сперматозоидов была одним из морфологических признаков, на основании которых из семейства Convolutidae Graff, 1905 было выделено новое семейство Isodiametridae Hooge & Tyler, 2005, куда наряду с другими был отнесен и вид *A. agile*.

По составу и расположению микротрубочек в аксонемах сперматозоидов вид *A. agile* отличается от представителей семейства Convolutidae, для которых характерны аксиальные цитоплазматические микротрубочки, а аксонемы имеют формулу  $9 + 0$ . Для *A. agile* характерно кортикальное расположение цитоплазматических микротрубочек, что сближает его с видами *Isodiametra pulchra*, *Praeconvoluta tigrina*, *Pseudaphanostoma smithii* [9, 10, 14], относимыми к новому семейству Isodiametridae. Кроме того, этот вид имеет совершенно особую формулу аксонем жгутиков, которая до сих пор, насколько нам известно, не была отмечена среди Acoela.

У большинства животных аксонемы жгутиков сперматозоидов устроены по «классической» схеме  $9 + 2$ , однако в пределах ряда групп наблюдаются отклонения от этой формулы. Так, у некоторых групп членистоногих, для которых характерно сперматофорное оплодотворение и ослабление двигательной активности сперматозоидов (например, у скорпионов и пауков), отмечена формула аксонем  $9 + 3$  (см. обзор в [15, 16]). Для аксонем жгутиков сперматозоидов большинства плоских червей характерна формула  $9 + \langle 1 \rangle$ , при которой по центру аксонемы проходит не микротрубочка, а электронноплотный тяж [4, 5]. Однако такого разнообразия строения аксонем сперматозоидов, как у Acoela ( $9 + 2$ ,  $9 + 1$ ,  $9 + 0$ , а по результатам настоящей работы и  $9 + 4$ ), пока не отмечено ни в одной другой группе животных. Наши исследования свидетельствуют о большем разнообразии ультраструктурных признаков организации Acoela, чем предполагалось ранее. Вполне возможно, что в данном случае мы имеем дело с примером крайней внутривидовой изменчивости на клеточном уровне. Тем не менее это тот самый случай, который просто нельзя оставить без внимания.

С тех пор, как были впервые открыты Acoela, не утихают споры об их филогенетическом положении в царстве животных. Одни зоологи считают эту группу наиболее примитивной из всех Bilateria [17–24], другие – вторично упрощившейся [25–29]. Таксономический статус этой группы тоже еще до конца не определен. По классическим классификациям Acoela считаются отрядом

класса Turbellaria, подкласса Archiophora (см. обзор в [24]). Ульрих Элерс [4] пересмотрел систему плоских червей, используя в первую очередь ультраструктурные признаки. У. Элерс и его последователи считают Turbellaria полифилетической (сборной) группой и выделяют Acoela вместе с близким отрядом Nemertodermatida в отдельный подтип Acoelomorpha. Наконец, по данным молекулярной биологии (результатам анализа последовательности 18S рДНК) многие современные авторы отделяют Acoela от остальных плоских червей и считают их сестринской группой для всех остальных Bilateria [30–32].

По нашему мнению, изучение ультраструктурных особенностей Acoela свидетельствует о том, что эта группа обладает многими примитивными (плезиоморфными) чертами строения. Вероятно, животные, напоминающие по своей организации Acoela, были предками Bilateria. Поиск новых путей эволюционного развития привел к появлению у Acoela богатого разнообразия признаков, в том числе и на ультраструктурном уровне. Такая морфологическая «неустойчивость» свидетельствует в пользу филогенетической примитивности этой группы.

### Summary

*Y.I. Zabolin, A.I. Golubev. Ultrastructure of Spermatozoa of Archaphanostoma agile (Acoela).*

The ultrastructure of spermatozoa is widely used in systematics of Acoela. Nevertheless we need the data on larger number of species for improving these phylogenetic constructions. The data on thin structure of spermatozoa of acoel *Archaphanostoma agile* are presented in this work. Two specific morphological features not known for other species of Acoela were found. The first one is connected with structure of tail region. The pair of electron-transparent ribbon-shaped cords is going along its whole length between the axonemes of flagella. The second feature is connected with unusual structure of the axonemes of flagella. Along with two "classic" microtubules, two oval structures of fewer diameters were found in the center of axoneme; the aberrant formula 9 + 4 is proposed to determine this condition. The specific features of axoneme of *A. agile* revealed by present investigation are an evidence of higher diversity of ultrastructural features of Acoela than previously expected.

**Key words:** Acoela, reproductive system, spermatozoa, ultrastructure.

### Литература

1. *Hendelberg J.* Functional aspects of flatworm sperm morphology // Afzelius B.A. (ed.) *The Functional Anatomy of Spermatozoon.* – London; New York: Pergamon Press, 1974. – P. 299–309.
2. *Hendelberg J.* Comparative morphology of turbellarian spermatozoa studied by electron microscopy // *Acta Zool. Fenn.* – 1977. – V. 154. – P. 149–162.
3. *Hendelberg J.* The phylogenetic significance of sperm morphology in the Platyhelminthes // *Hydrobiologia.* – 1986. – V. 132. – P. 53–58.
4. *Ehlers U.* *Das Phylogenetische System der Plathelminthes.* – Stuttgart; New York: Gustav Fischer Verlag, 1985. – 317 S.
5. *Райкова О.И.* О филогенетическом значении ультраструктурных признаков турбеллярий // *Труды Зоол. Ин-та АН СССР.* – 1991. – Т. 241. – С. 26–52.
6. *Райкова О.И.* Сравнительное исследование ультраструктуры бескишечных турбеллярий: Автореф. ... канд. биол. наук. – Л., 1989. – 23 с.

7. *Raikova O.I.* Immunocytochemical analysis of Acoela sperms as an approach to understanding phylogenetic position of this group // *Doklady Biol. Sci.* – 2002. – V. 382. – P. 48–50.
8. *Hooge M., Haye P., Tyler S., Litvaitis M., Kornfield I.* Molecular systematics of the Acoela (Acoelomorpha, Platyhelminthes) and its concordance with morphology // *Mol. Phylogen. Evol.* – 2002. – V. 24. – P. 333–342.
9. *Petrov A., Hooge M., Tyler S.* Ultrastructure of sperms in Acoela (Acoelomorpha) and its concordance with molecular systematics // *Invertebrate Biol.* – 2002. – V. 123, No 3. – P. 183–197.
10. *Петров А.А.* Ультраструктурные и гистохимические особенности половой системы бескишечных турбеллярий (Acoela) и их филогенетическое значение: Автореф. ... канд. биол. наук. –СПб., 2007. – 21 с.
11. *Петров А.А.* Морфологическое разнообразие и пути формирования склеротизированных структур у бескишечных турбеллярий (Acoela, Acoelomorpha) // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2007. – Т. 149, кн. 3. – С. 138–142.
12. *Dorjes J.* Die Acoela (Turbellaria) der Deutschen Nordseeküste und ein neues System der Ordnung // *Zeitschr. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* – 1968. – Bd. 6. – S. 56–452.
13. *Apelt G.* Fortpflanzungsbiologie, Entwicklungszyklen und vergleichende Fruhentwicklung acoeler Turbellarien // *Marine Biol.* – 1969. – V. 4. – P. 267–325.
14. *Hooge M., Tyler S.* New tools for resolving phylogenies: a systematic revision of Convolutidae (Acoelomorpha, Acoela) // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* – 2005. – V. 43, No 2. – P. 100–113.
15. *Реунов А.А., Малахов В.В.* Эволюция строения сперматозоидов у беспозвоночных // *Усп. соврем. биол.* – 1993. – Т. 113, Вып. 1. – С. 3–18.
16. *Дроздов А.Л., Иванков В.Н.* Морфология гамет животных. Значение для систематики и филогенетики. – М.: Круглый год, 2000. – 460 с.
17. *Беклемишев В.Н.* Класс Ресничных червей (Turbellaria) // *Руководство по зоологии.* – М.-Л.: Сов. наука, 1937. – Т. 1. – С. 386–457.
18. *Беклемишев В.Н.* Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: в 2 т. – М.: Наука, 1964,
19. *Graff L.* Die organization der Turbellaria Acoela. – Leipzig, 1891. – 90 S.
20. *Нутан Л.Н.* The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The acoelomate Bilateria, V. 2. – New York, Toronto, London, 1951. – 550 p.
21. *Иванов А.В.* Происхождение многоклеточных животных (филогенетические очерки). – Л.: Наука, 1968. – 287 с.
22. *Иванов А.В.* К вопросу о примитивности бескишечных ресничных червей Acoela // *Зоол. журн.* – 1971. – Т. 50, Вып. 5. – С. 621–632.
23. *Мамкаев Ю.В.* Очерки по морфологии бескишечных турбеллярий // *Труды Зоол. Ин-та АН СССР.* – 1967. – Т. 44. – С. 26–108.
24. *Иванов А.В., Мамкаев Ю.В.* Ресничные черви (Turbellaria), их происхождение и эволюция. – Л.: Наука, 1973. – 221 с.
25. *Karling T.G.* Zur Morphologie und Systematik der Alloecoela Cumulata und Rhabdo-coela Lecithophora (Turbellaria) // *Acta Zool. Fennica.* – 1940. – V. 26. – P. 1–260.
26. *Ливанов Н.А.* Пути эволюции животного мира (анализ организации главнейших типов многоклеточных животных). – М.: Сов. наука, 1955. – 400 с.
27. *Ливанов Н.А.* О происхождении Metazoa // *Зоол. журн.* – 1970. – Т. 49, Вып. 4. – С. 517–532.

28. Ax P. Relationship and phylogeny of the Turbellaria // Dougherty E.C (ed.). The Lower Metazoa. – Berkeley; Los Angeles: Univ. Calif. Press, 1963. – P. 191–224.
29. Федотов Д.М. Эволюция и филогения беспозвоночных животных. – М.: Наука, 1966. – 404 с.
30. Ruiz-Trillo I., Riutort M., Littlewood D., Herniou E., Baguna J. Acoel flatworms: earliest extant bilaterian metazoans, not members of Platyhelminthes // Science. – 1999. – V. 283. – P. 1919–1923.
31. Baguna J., Ruiz-Trillo I., Paps J., Loukota M., Ribera C., Jondelius U., Riutort M. The first bilaterian organisms: simple or complex? New molecular evidence // Int. J. Dev. Biol. – 2001. – V. 45. – P. S133–S134.
32. Glenner H., Hansen A., Sorensen M., Ronquist F., Huelsenbeck J., Willerslev E. Bayesian inference of the Metazoan phylogeny: a combined molecular and morphological approach // Current Biol. – 2004. – V. 14. – P. 1644–1649.

Поступила в редакцию  
25.08.08

---

**Заботин Ярослав Игоревич** – аспирант кафедры зоологии беспозвоночных Казанского государственного университета.

E-mail: [Yaroslav\\_Zabotin@rambler.ru](mailto:Yaroslav_Zabotin@rambler.ru)

**Голубев Анатолий Иванович** – доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии беспозвоночных Казанского государственного университета.

E-mail: [Anatolii.Golubev@ksu.ru](mailto:Anatolii.Golubev@ksu.ru)