на правах рукописи

Шафигуллина Екатерина Евгеньевна

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ГАМЕТОГЕНЕЗА ACOELA И PLATHELMINTHES В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ АСПЕКТЕ

03.02.04 – Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2019 г.

Работа выполнена на кафедре зоологии и общей биологии института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Научный руководитель: Кандидат биологических наук,
доцент кафедры зоологии и общей биологии
Казанского (Приволжского)
федерального университета
Заботин Ярослав Игоревич

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
кафедры зоологии беспозвоночных
МГУ им. М.В. Ломоносова
Бисерова Наталья Михайловна

Кандидат биологических наук,
зав. лабораторией гидробиологии
Института проблем экологии и
недропользования АН РТ
Токинова Римма Петровна

Ведущая организация: Зоологический институт РАН

Защита состоится 12 апреля 2019 г. в 16.00 ч. на заседании диссертационного совета КФУ.03.01. № 01-03/1456 от 21.12.2018 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Автореферат разослан «____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Порфирьев А.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследование организации плоских червей играет значительную роль при реконструкции ранних этапов эволюции животного царства, поскольку именно у этой группы формируется эволюционно-морфологический план строения, характерный для высших Bilateria (Беклемишев, 1952; Ливанов, 1955; Иванов, Мамкаев, 1973). Особый интерес для филогенетики билатерий представляют также Acoela – группа мелких червеобразных беспозвоночных, ранее причислявшаяся к типу Plathelminthes (Иванов, Мамкаев, 1973), а в настоящее время обычно отделяемая от него на основе молекулярно-генетических данных (Ruiz-Trillo et al., 1999; Cannon et al., 2016).

Среди многочисленных морфологических признаков при построении филогении животного царства на протяжении многих лет используются ультраструктурные особенности половой системы, особенно половых клеток и гаметогенеза (Реунов, Малахов, 1993; Дроздов, Иванков, 2000; Реунов, 2005). Исследование ультраструктуры половой системы Acoela и плоских червей особенно актуально, принимая во внимание сложность и многообразие ее строения на фоне относительной простоты организации остальных систем органов. Именно на особенностях морфологии копулятивных органов и ультраструктуры половых клеток во многом традиционно базируется филогения обоих этих таксонов (Hendelberg, 1974, 1977, 1986; Ehlers, 1985, Райкова, 1991). Однако до сих пор далеко не для всех представителей Acoela и различных групп Plathelminthes описаны эти филогенетически значимые признаки, что оставляет заметные пробелы при реконструкции хода эволюции половых клеток в пределах этих таксонов.

Паразитические плоские черви (Neodermata) также представляют несомненный интерес для решения современных задач теоретической паразитологии, таких как исследование морфологических адаптаций к паразитизму у различных групп гельминтов на ультратонком уровне. Фундаментальная перестройка организации репродуктивной системы у паразитических классов Plathelminthes особенно ярко проявляется в изменениях

ультраструктуры сперматозоидов и появлении особого неодерматного типа спермиогенеза (Kornakova, Joffe, 1999; Littlewood et al., 1999a, b). При этом указанные особенности половых клеток приобретают ведущее значение для установления филогенетических связей между неодерматами и свободноживущими плоскими червями.

Цель работы была сформулирована следующим образом: провести сравнительно-морфологический анализ ультраструктурных особенностей сперматозоидов, яйцеклеток и гаметогенеза у представителей Acoela и Plathelminthes.

В качестве объекта исследования нами были выбраны группы червей, обозначающие ключевые вехи в эволюционном развитии Bilateria. Представители Acoelomorpha представляют интерес как архаичная группа билатерий со спорным филогенетическим положением. В пределах типа Plathelminthes были исследованы просериаты (Proseriata) как представители базальных неофор; трикладиды (Tricladida) как наиболее высокоорганизованные ресничные черви; прямокишечные (Rhabdocoela), традиционно сближаемые с Neodermata, а также калипторинхии (Kalyptorhynchia), представляющие собой специализированную и обособленную группу среди прямокишечных турбеллярий. Для сравнительного анализа ультраструктуры сперматозоидов и спермиогенеза свободноживущих и паразитических плоских червей был выбран «классический» объект *Fasciola hepatica* (Trematoda).

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи:**

- Исследовать ультраструктуру мужских и женских половых клеток двух видов Acoela и шести видов плоских червей из таксонов Proseriata, Tricladida, Rhabdocoela (включая Kalyptorhynchia) и Trematoda.
- Описать особенности процессов спермиогенеза и оогенеза у представителей ацел и различных групп свободноживущих и паразитических червей и определить их филогенетическую роль.
- Выявить закономерности эволюционных изменений половых клеток исследуемых таксонов на основе литературных и оригинальных данных.

Научная новизна результатов. Впервые изучена ультраструктура спермиев и процесс их формирования у пяти видов турбеллярий *Monocelis lineata* (Müller O.F., 1773), *M. fusca* Örsted, 1843 (Proseriata), *Uteriporus vulgaris* Bergendal, 1890 (Tricladida), *Graffiellus croceus* Fabricius, 1826 (Kalyptorhynchia) и *Provortex karlingi* Ax, 1951 (Rhabdocoela). Получены новые данные по строению зрелых сперматозоидов и особенностям спермиогенеза у бескишечных турбеллярий *Arhaphanostoma agile* (Jensen, 1878) и *Convoluta convoluta* (Abildgaard, 1806) (Acoela) и трематоды *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Neodermata). Впервые исследовано ультратонкое строение яйцеклеток и желточников у *C. convoluta, U. vulgaris, G. croceus* и *P. karlingi.* Впервые описаны примеры рекапитуляции на клеточном уровне в ходе спермиогенеза у *C. convoluta, U. vulgaris, P. karlingi, G. croceus*. На основе оригинальных данных выявлены основные тенденции в эволюции гамет Acoela и Plathelminthes на ультраструктурном уровне и предложена схема эволюционно-морфологических преобразований половых клеток в пределах изученных таксонов.

Положения, выносимые на защиту.

1. К основным направлениям эволюции сперматозоидов плоских червей относятся усовершенствование локомоторного аппарата, олигомеризация митохондрий и дополнительных включений, а также реорганизация ядерного аппарата. Для эволюции спермиев бескишечных турбеллярий характерна лишь первая тенденция – усовершенствование локомоторного аппарата.

2. В ходе спермиогенеза у высокоорганизованных представителей Acoela и Plathelminthes наблюдается рекапитуляция на клеточном уровне, проявляющаяся в наличии ультраструктурных особенностей, свойственных сперматозоидам их предковых форм.

3. Сперматозоиды Acoela и архаичных отрядов Plathelminthes характеризуются большим морфологическим разнообразием, в то время как для мужских гамет более специализированных таксонов неоофорных турбеллярий характерна консервативность строения.

4. Сходство ультраструктурных особенностей сперматозоидов и спермиогенеза триклад и трематод свидетельствует об эволюционной преемственности гаметогенеза свободноживущих и паразитических плоских червей.

Личное участие автора. Автором был произведен сбор материала, его пробоподготовка к ТЭМ, изучение и фотографирование срезов, описание и анализ полученных электронограмм, подготовка и публикация статей и докладов, представление результатов работы на всероссийских и международных конференциях.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе работы оригинальные ультраструктурные данные подтверждают значимость морфологических особенностей половых клеток бескишечных турбеллярий и плоских червей для филогенетических построений и могут быть использованы при реконструкции ранних этапов эволюции Metazoa. Выявленные в ходе исследования эволюционно-морфологические закономерности также расширяют имеющиеся представления о рекапитуляции предковых признаков в биологии. Полученные результаты могут быть использованы при составлении лекционных курсов «Биология размножения и развития», «Зоология беспозвоночных», «Сравнительная анатомия беспозвоночных».

Апробация работы. Результаты исследования представлялись и обсуждались на итоговых научных конференциях Казанского (Приволжского) федерального университета, на III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), на XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2011» (Москва, 2011), на XLIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011), на II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова (Санкт-Петербург, 2011), на 50-й Юбилейной Международной научно-студенческой

конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012), на Международной научно-практической конференции «Экология, эволюция и систематика животных» (Рязань, 2012), на V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012), на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы биологии и биологического образования в педагогических вузах» (Новосибирск, 2013), на Научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (Москва, 2013), на VIII Международной заочной конференции «Современные проблемы зоологии и паразитологии» (Воронеж, 2016), на III Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» к 110-летию со дня рождения академика А.В. Иванова (Санкт-Петербург, 2016), на 4-м Международном конгрессе по морфологии беспозвоночных (4th International Congress on Invertebrate Morphology, Москва, 2017), на XIII Всероссийской конференции с международным участием «Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря» (Санкт-Петербург, 2017), на Всероссийской конференции с международным участием «Современная паразитология: основные тренды и вызовы (VI Съезд Паразитологического общества)» (Санкт-Петербург, 2018), на юбилейной конференции в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных МГУ «Зоология беспозвоночных – Новый век» (Москва, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 работы, в том числе четыре статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ и индексируемых в наукометрических базах Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка цитированной литературы (177 источника, из них 132 на иностранных языках). Работа изложена на 155 страницах и включает 51 рисунок.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доценту кафедры зоологии и общей биологии КФУ Я.И. Заботину

за постоянное внимание, ценные указания и советы в ходе выполнения работы над диссертацией. Автор благодарит профессора А.И. Голубева и заведующего кафедрой зоологии и общей биологии КФУ Р.М. Сабирова за ценные советы. Автор благодарит всех сотрудников кафедры за проявленное участие, особенно доцента М.М. Сальникову за помощь при подготовке образцов для электронной микроскопии, а также главного инженера проекта Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ доцента В.Г. Евтюгина и младшего научного сотрудника Виртуальной научно-исследовательской лаборатории OpenLab «Экстремальная биология» КФУ Г.Р. Газизову за техническую поддержку и помощь в сборе материала. Автор также очень признателен Д.В. Максудову за помощь в создании объемных моделей и реконструкций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Данная глава содержит обзор литературы по различным взглядам на систематику плоских червей и бескишечных турбеллярий на основе морфологии половой системы. Приводятся сведения по строению половой системы у исследуемых групп. Особое внимание уделено ультратонкому строению половых клеток Acoela и Plathelminthes.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Ацелы *Archaphanostoma agile* и *Convoluta convoluta* и свободноживущие ресничные черви *Monocelis fusca, M. lineata, Provortex karlingi, Uteriporus vulgaris, Graffiellus croceus* были собраны в летний период с 2008 по 2011 год на литорали и в смывах с водорослей островов Средний и Сидоров Керетского архипелага Белого моря. Мариты *Fasciola hepatica* были получены из печени крупного рогатого скота в Буинском районе Республики Татарстан в летний период 2012 г. Свободноживущие черви были зафиксированы целиком в 1 % глютаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере, у *F. hepatica* фиксировались лишь

фрагменты марит, содержащие семенники. Полутонкие срезы (3–4 мкм) были получены на микротоме LKB. Срезы окрашивались на предметных стеклах метиленовым синим. Просмотр их проводился на световом микроскопе LABOVAL 4. Ультратонкие срезы были получены с помощью ультрамикротома «Reichert-Jung», контрастированы уранил-ацетатом (50 мин при 60°С) и цитратом свинца и изучены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100 CX. Просмотр полутонких срезов для световой гистологии проводился на световом микроскопе Carl Zeiss Axio Imager A2. Промеры электронограмм проводились с помощью программы Axio Vision Rel. 4.8. Объемные модели сперматозоидов были сделаны в программе для моделирования, анимации и визуализации Autodesk 3ds Max. В главе также приведены систематическое положение и краткая характеристика восьми исследованных видов с описанием их морфологии и биологии.

ГЛАВА 3. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ООГЕНЕЗА И ЯЙЦЕКЛЕТОК ACOELOMORPHA И PLATHELMINTHES

3.1. Результаты. Оогенез представителей отряда Acoela был изучен на примере *Convoluta convoluta*. Строение женских половых клеток Plathelminthes было исследовано на примере неоофорных турбеллярий *Monocelis lineata, Uteriporus vulgaris, Graffiellus croceus* и *Provortex karlingi*.

Ранние ооциты C. convoluta представляют собой крупные округлые клетки до 7-8 мкм в диаметре. Ооплазма заполнена большим количеством мелких митохондрий, каналов шероховатой и гладкой ЭПС, свободными рибосомами, диктиосомами аппарата Гольджи. Ооциты следующей стадии созревания, условно названные *«промежуточными»*, имеют округлую форму (диаметром более 10 мкм). Митохондрии заметно увеличены в размерах (до 1 мкм в поперечнике) и мощно разрастаются в перикарионе каналы гладкой и шероховатой ЭПС, которые достигают ширины 0,5 мкм, что придает им довольно необычный, «отечный» вид. Общая картина строения ооплазмы дополняется крупными желточными каплями (до 2 мкм в диаметре). Наиболее интересными структурами в созревающих

ооцитах оказались специфические округлые образования диаметром 0,7-1 мкм, по внешнему виду напоминающие пищеварительные вакуоли центральной паренхимы. Их содержимое включает мелкие прозрачные пузырьки и электронно-плотные частицы, вероятно, представляющие собой клеточные дериваты. *Зрелые ооциты* достигают 33 мкм в диаметре и лежат в толще паренхимы предротовой области. Дополнительных клеток, окружающих и питающих яйцеклетки, обнаружено не было.

Ооциты M. lineata представляют собой крупные клетки (до 12 мкм) с центральным ядром (до 5 мкм) и хорошо развитым ядрышком (до 2 мкм). Ооплазма клеток заполнена многочисленными митохондриями мелких размеров, каналами ЭПС, рибосомами. Вдоль цитоплазматической мембраны яйцеклетки в один ряд располагаются мелкие электронно-плотные кортикальные гранулы до 0,3 мкм в диаметре. Также в ооплазме обнаружены немногочисленные электронно-плотные гранулы, достигающие размеров 2-5 мкм. *Вителлоциты* имеют мощно развитую систему ЭПС в области перикариона и содержат желточные гранулы размером 1–5 мкм. *Опорные клетки* залегают по периферии развивающихся ооцитов, а их длинные цитоплазматические отростки тянутся далеко между развивающимися ооцитами.

Яйцеклетки U. vulgaris достигают 23 мкм в диаметре. Ооплазма густо заполнена каналами ЭПС, рибосомами, крупными митохондриями (до 3 мкм в поперечнике), цистернами комплекса Гольджи. Обращает на себя внимание необычная морфология митохондрий и тенденция к расположению по периферии яйцеклетки. В ооплазме присутствует два типа цитоплазматических включений: содержимое включений первого типа (до 1,2 мкм в диаметре) неоднородно – каждая гранула состоит из электронно-прозрачной сердцевины и электронно-плотного ободка; такие включения встречаются ближе к перикариону. Включения второго типа (до 1,5 мкм) отличаются средней электронной плотностью, сконцентрированы на периферии яйцеклетки и часто образуют необычные ассоциации с митохондриями, заходя в инвагинации мембран последних. Развивающиеся ооциты окружены *вителлоцитами* (до 8 мкм в диаметре), в

которых отмечено четыре типа включений: гранулы, формирующие оболочку («eggshell-forming granules»); желточные гранулы (до 3-4 мкм) с электронно-плотным контуром; мелкие плотные гранулы, встречающиеся в поздних вителлоцитах; включения с мультигранулярной структурой (до 5 мкм).

Вителлоциты G. croceus представляют собой крупные овальные клетки размером до 12 мкм. Цитоплазма средней электронной плотности содержит многочисленные свободные рибосомы и митохондрии овальной или гантелевидной формы до 2,5 мкм в длину, в перикарионе отмечены короткие каналы ЭПС.

Ранние ооциты P. karlingi собраны в небольшие группы и достигают 3,5 мкм в поперечнике. *Зрелые ооциты* отличаются значительно более крупными размерами (до 51,6 мкм в диаметре). В них были обнаружены электронно-прозрачные гранулы диаметром до 3,7 мкм, заполненные хлопьевидным содержимым средней электронной плотности. Зрелые яйцеклетки целиком окружены многослойными обкладками из длинных тонких отростков *дополнительных клеток*. *Ранние вителлоциты* расположены по периферии гермария и имеют округлую или овальную форму. Ядро достигает в диаметре 4,5 мкм и занимает 1/4 от общего объема клетки. *Зрелые вителлоциты* достигают 12 мкм в поперечнике и содержат большое количество желточных гранул диаметром от 1,25 до 2,75 мкм.

3.2. Обсуждение. Женские гонады Acoela и Plathelminthes характеризуются широким разнообразием морфологических и цитологических планов строения в разных таксонах, поэтому некоторые характеристики могут быть успешно применены в вопросах филогенетики.

Обнаруженные в «промежуточных ооцитах» *C. convoluta* структуры, имеющие сходство с пищеварительными вакуолями и состоящие из плотно упакованных каналов, дают возможность предположить, что ооциты способны к фагоцитозу (Чернова и др., 2012а). В литературе встречаются сведения об активном захватывании симбиотических зооксантелл развивающимися ооцитами ацеломорф из рода *Waminoa* (Barneah et al., 2007). Но данных о фагоцитозе каких-

либо других элементов в литературе нет. Вероятно, способность ооцитов *C. convoluta* к фагоцитозу следует считать следствием еще слабой клеточной дифференцировки половых клеток Acoela (Чернова и др., 2012а).

В пределах макротаксона Trepaxonemata выделяется группа Neoophora, характеризующаяся дифференцировкой женской половой системы на гермарий и вителлярий. Наличие автосинтетического желтка в ооцитах некоторых неоофорных турбеллярий может интерпретироваться как примитивная черта, унаследованная от предковых форм с энтолецитальными яйцами (Gremigni et al., 1986). Взаимное расположение созревающих яйцеклеток и окружающих их по периферии дополнительных клеток («accessory cells»), обнаруженное у *M. lineata* и *P. karlingi*, также характерно для гонад некоторых представителей Dalyellioida, Typhloplanoida, Kalyptorhynchia и Temnocephalida (Sopott-Ehlers, 1986; Lucchesi et al., 1995; Falleni et al., 1998). Благодаря своим необычно длинным отросткам дополнительные клетки играют важную роль в трофике развивающихся яйцеклеток (Falleni et al., 1998; Gremigni, Falleni, 1998). Дальнейшая эволюция неоофорных турбеллярий заключается в усилении дифференцировки на гермарий и вителлярий и увеличении многообразия клеточных включений в ооцитах и вителлоцитах.

ГЛАВА 4. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И СПЕРМАТОЗОИДОВ ACOELOMORPHA И PLATHELMINTHES

4.1. Результаты. Сперматозоиды Acoela имеют вытянутую нитевидную форму и состоят из трех отделов – «головки» с ядром, «шейки» с митохондриями и различными включениями и «хвостика». По всей длине спермия проходят два погруженных инвертированных жгутика. Формула аксонем и положение свободных микротрубочек в пределах этого таксона сильно различаются.

Сперматозоид *Archaphanostoma agile* отличается наружной орнаментацией. В средней части содержится множество митохондрий и два типа включений: многочисленные овальные или вытянутые светопреломляющие гранулы различных размеров, а также электронно-плотные гранулы (Рисунок 1*а*). Формула

аксонемы может быть представлена классическим типом строения 9+2, однако, наряду с этим встречаются аксонемы, где помимо двух центральных микротрубочек отмечены еще две меньшего диаметра, в последнем случае формула аксонемы принимает вид 9+4. Аксонемы с внутренней стороны охвачены дополнительными цитоплазматическими обкладками. По бокам от аксонем расположены уплотнения везикулярного типа. Свободные микротрубочки занимают кортикальное положение.

В шейке сперматозоида *Convoluta convoluta* содержатся многочисленные митохондрии, включения двух типов и светопреломляющие гранулы. Локомоторный аппарат представлен двумя инкорпорированными жгутиками с формулой аксонемы 9+0 (Рисунок 1*b*) и аксиальным цилиндром из микротрубочек. Каждая аксонема «опоясана» дополнительной цитоплазматической мембраной.

Исследуемые отряды плоских червей (Proseriata, Tricladida, Rhabdocoela) относятся к группе Trepaxonemata (Ehlers, 1985). Спермии этого таксона характеризуются нитевидной формой клетки, двумя свободными или инкорпорированными жгутиками с формулой аксонем 9+«1», волокнистым хроматином в ядре, множеством электронно-плотных гранул и кортикальными микротрубочками.

Сперматозоид *Monocelis lineata* несет два свободных жгутика и содержит множество мелких митохондрий и включения двух типов, хаотично рассеянных по всей цитоплазме спермия вдоль длинного вытянутого ядра (Рисунок 1*c*).

Спермии *M. fusca* отличаются от мужских гамет родственного вида *M. lineata* только характером пространственного расположения митохондрий и включений. Митохондрии группируются преимущественно с одной стороны ядра, тогда как включения занимают противоположную сторону (Рисунок 1*d*).

Основной объем тела спермия *Uteriporus vulgaris* занимает длинное вытянутое ядро и единственная митохондрия (Рисунок 2*a*).

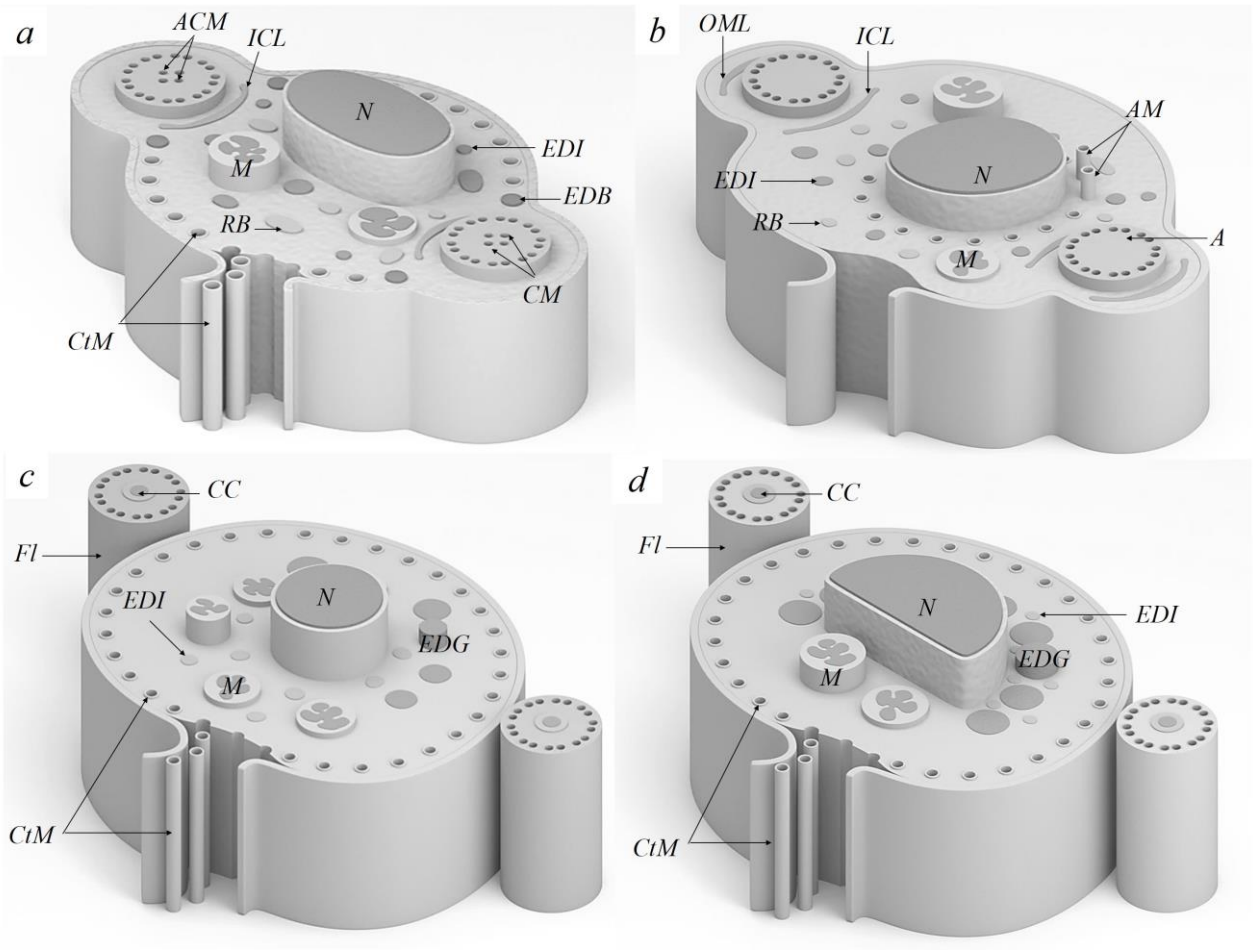

Рисунок 1. Объемные модели строения зрелых сперматозоидов: *a – A. agile; b – C. convoluta; c – M. lineata*; *d – M. fusca*. *A* – аксонема жгутика, *ACM* – дополнительные центральные микротрубочки, *AM* – аксиальные микротрубочки, *CC* – центральный цилиндр, *CM* – центральные микротрубочки, *CtM* – кортикальные микротрубочки, *EDB* – электронно-плотные уплотнения, *EDG* – электронно-плотные гранулы, *EDI* – электронно-плотные включения, *Fl* – жгутик, *ICL* – внутреннее мембранное полукружие, *M* – митохондрии, *N* – ядро, *OML* – наружное мембранное полукружие, *RB* – светопреломляющие гранулы.

Ядро содержит два четко различимых по структуре и плотности компонента: мелкозернистый равномерно распределенный по кариоплазме хроматин средней электронной плотности и 4 электронно-плотных тяжа с ламеллярной структурой. Локомоторный аппарат спермия включает два свободных ветвящихся жгутика. «Ветви» содержат отдельные микротрубочки, окруженные цитоплазматической мембраной. Ближе к аксонеме жгутика микротрубочки собраны в группы по пять, затем они распадаются на более мелкие группы (по четыре, три, две) и, наконец, «истончаются» до одной микротрубочки.

Основной объем сперматозоида *Graffiellus croceus* занимает вытянутое ядро, цепочка включений и единственная удлиненная митохондрия (Рисунок 2*b*). Включения, собранные в цепочку, представляют собой электронно-прозрачные гранулы с плотным содержимым, сдвинутым к одному из полюсов включения. Спермий несет два инкорпорированных жгутика с формулой аксонем 9+«1».

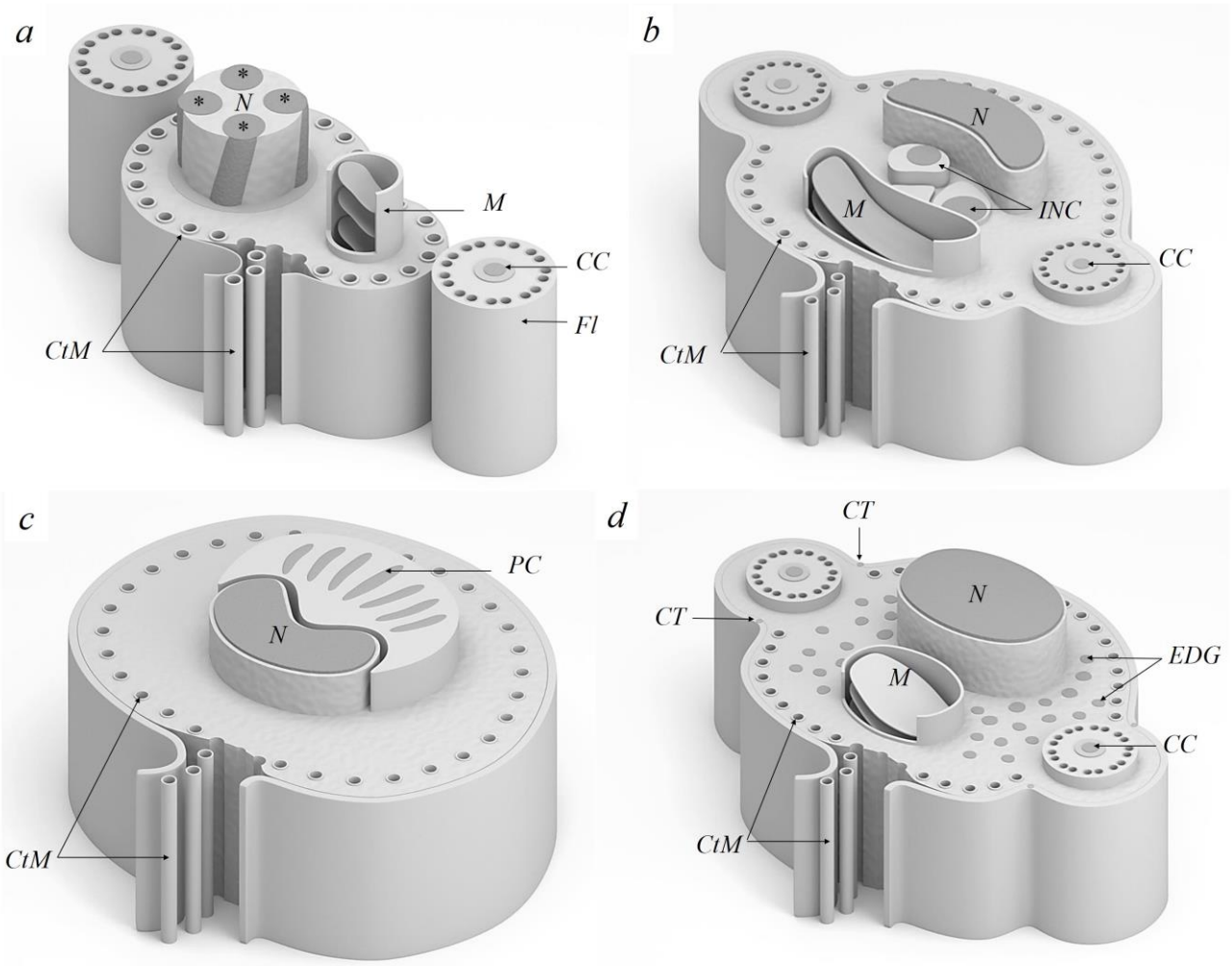

Рисунок 2. Объемные модели строения зрелых сперматозоидов: *a – U. vulgaris; b – G. croceus; c – P. karlingi*; *d – F. hepatica. CC* – центральный цилиндр, *CT* – места погружения жгутиков, *CtM* – кортикальные микротрубочки, *EDG* – электронно-плотные гранулы, *Fl* – жгутик, *INC* – цепочка включений, *M* – митохондрии, *N* – ядро, *PC* – перинуклеарное скопление. Звездочками обозначены хроматиновые тяжи в ядре.

Спермии *Provortex karlingi* лишены жгутиков (Рисунок 2*c*). Гиалоплазма спермиев густо заполнена электронно-плотными включениями, объединенными в сложную структуру, называемую в литературе «перинуклеарным скоплением» (Sopott-Ehlers, Ehlers, 1995). На продольных срезах она выглядит как скопление

гранул, располагающихся в шахматном порядке в четыре ряда, а на поперечных напоминает по форме розетку. Эта структура полукольцом охватывает дистальную половину ядра; в нее также частично погружается ряд митохондрий.

Сперматозоид *Fasciola hepatica* снабжен двумя инкорпорированными жгутиками (Рисунок 2*d*). Внутреннюю клеточную мембрану подстилает один ряд кортикальных микротрубочек. Передний отдел сперматозоида занимают единственная сильно вытянутая митохондрия и аксонемы жгутиков. Средний отдел сперматозоида содержит окончание митохондрии и передний конец ядра с хроматином, имеющим волокнистую структуру. С каждой стороны погрузившегося жгутика находится по одному электронно-плотному углублению.

4.2. Обсуждение. В ходе изучения спермиогенеза *C. convoluta* нами обнаружены две важные особенности. Первая особенность – смена положения свободных микротрубочек (Чернова и др., 2012a). Поначалу они располагаются хаотично по всей цитоплазме сперматоцита, затем занимают кортикальное положение по периферии клетки, что характерно для более примитивных семейств Acoela (Jondelius et al., 2011). В дальнейшем они участвуют в образовании аксиального цилиндра. Вторая особенность касается формулы аксонем. Перед самым кончиком спермия выявлен короткий участок аксонемы с формулой 9+2 вместо 9+0 (Чернова и др., 2012a; Shafigullina, Zabotin, 2017a), что также было отмечено для других представителей семейств Convolutidae и Sagittiferidae (Raikova, Justine, 1994; Raikova et al., 1998). Таким образом, две эти особенности могут представлять собой примеры рекапитуляции на клеточном уровне у Acoela.

В ходе спермиогенеза Plathelminthes также проявляются яркие черты рекапитуляции признаков на клеточном и субклеточном уровнях.

Одним из характерных признаков спермиев *U. vulgaris* является наличие единственной удлиненной митохондрии (Чернова и др., 2014; Shafigullina, Zabotin, 2017a). По мнению некоторых авторов, она образуется в спермиогенезе путем «сплавления» всех митохондрий сперматиды (Silveira, Porter, 1964; Charni et al., 2010). В сперматидах *U. vulgaris* митохондрии поначалу кольцом

располагаются вокруг ядра, затем с появлением комплекса Гольджи они перемещаются к его цис-поверхности. На более поздних стадиях между большими скоплениями митохондрий, отдельных мембран, и зрелой поверхностью комплекса Гольджи заметно множество мелких пузырьков выделяемых им, которые возможно и будут участвовать в формировании единой мембраны митохондрии (Чернова и др., 2014).

Ультраструктурная организация спермиев *P. karlingi* может считаться примером крайней специализации мужских половых клеток турбеллярий. В первую очередь она проявляется в редукции жгутиков и формировании «перинуклеарного скопления» электронно-плотных гранул (Шафигуллина и др., 2015; Shafigullina, Zabotin, 2017a). Несмотря на полное отсутствие жгутиков у зрелого сперматозоида *P. karlingi*, в ходе спермиогенеза проявляются особенности, характерные для жгутиковых спермиев. В частности, в сперматидах исследуемого вида было обнаружено интерцентриолярное тельце, участвующее в формировании жгутиков. Эта же структура ранее была описана в сперматидах близкого вида *P. tubiferus* (Sopott-Ehlers, Ehlers, 1995). И хотя в ходе спермиогенеза аксонемы *P. karlingi* не дифференцируются, а интерцентриолярное тельце резорбируется (как и в случае *P. tubiferus*), сам факт его наличия, бесспорно, указывает на происхождение безжгутиковых гамет рода *Provortex* от типичных жгутиковых. В сперматозоидах видов рода *Provortex*, по всей вероятности, локомоторную функцию наряду с кортикальными микротрубочками частично принимает на себя «перинуклеарное скопление» гранул (Шафигуллина и др., 2015).

Электронно-плотные гранулы в спермиях *G. croceus* упорядочены в цепочку, которая иногда оттесняет ядро и митохондрию на периферию. Следует отметить, что в сперматидах включения равномерно рассеяны по цитоплазме клетки, что типично для архаических отрядов плоских червей, и лишь в зрелом сперматозоиде они выстраиваются в цепочку (Shafigullina, Zabotin, 2017a).

Сперматозоиды просериат *M. lineata* и *M. fusca* характеризуются большим сходством в морфологии, однако даже у таких близкородственных видов

наблюдается явное различие в пространственном расположении органелл. На наш взгляд, это может являться предпосылкой к дальнейшему формированию единственной митохондрии и объединению включений в цепочку, характерных для более высокоорганизованных трепаксонемат.

В отличие от базальных неоофор (Proseriata), трикладиды характеризуются строго консервативным планом строения мужских половых клеток, который проявляется уже у базальных представителей этого отряда (например, *U. vulgaris*). Данный вывод хорошо соотносится с заключением Ю.В. Мамкаева (1987) о том, что в специализированных таксонах морфологическое разнообразие существенно ниже, чем в примитивных. По нашему мнению, установленная им важная эволюционная закономерность может быть обозначена как «закон прогрессивной универсализации Ю.В. Мамкаева» (Чернова и др., 2014).

В аксонемах незрелых сперматозоидов *F. hepatica* нами впервые отмечены мелкие электронно-плотные гранулы вместо радиальных спиц, в то время как зрелые спермии имеют аксонему с типичными спицами. Подобное явление было описано нами и для спермиев триклады *U. vulgaris* (Чернова и др., 2014) и, вероятно, в обоих случаях может быть связано с разными стадиями созревания мужских половых клеток. Изменения в структуре митохондрий в процессе сперматогенеза, приводящие к формированию единой митохондрии зрелого сперматозоида, были описаны как для многих видов трематод (Stitt, Fairweather, 1990; Ndiaye et al., 2003, Bakhoum et al., 2017), так и для свободноживущих плоских червей – в частности, триклад (Чернова и др., 2014). На наш взгляд, это может свидетельствовать об эволюционной преемственности ультраструктурных особенностей половых клеток свободноживущих и паразитических плоских червей (Shafigullina, Zabotin, 2017a).

В данной работе были исследованы сперматозоиды и сперматогенез у представителей почти всех групп турбеллярий, в разное время сближаемых с Neodermata. По нашему мнению, ультраструктура сперматозоидов и особенности формирования мужских половых клеток у *F. hepatica* наиболее схожи с *U. vulgaris*. У обоих видов в спермиогенезе происходит сплавление множества

митохондрий в одну, и зрелый сперматозоид имеет единственную сильно вытянутую митохондрию (Чернова и др., 2014; Shafigullina, Zabotin, 2017a). Кроме того, в составе локомоторного аппарата в незрелых сперматозоидах обоих видов впервые обнаружен межаксонемальный гликоген. Вместо радиальных спиц незрелые спермии *U. vulgaris* содержат 18 мелких гликогеновых гранул (Чернова и др., 2014), а в незрелых спермиях *F. hepatica* их количество меньше, чем у утерипоруса. Таким образом, на основании этих признаков, можно предположить, что Neodermata состоят в более близком родстве с Tricladida, нежели с Rhabdocoela, как традиционно предполагалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя литературные и оригинальные данные по ультраструктурным особенностям половых клеток Acoelomorpha и Plathelminthes, основные этапы эволюции мужских и женских гамет двух исследуемых таксонов можно представить следующим образом (Рисунок 3). Как у Acoela, так и у Plathelminthes первым этапом эволюционных преобразований сперматозоидов является перестройка локомоторного аппарата. Для архаических семейств Acoela характерно кортикальное положение микротрубочек и стандартная формула аксонемы 9+2. Более высокоорганизованные Acoela объединяются в группу Aberrantospermata (Jondelius et al., 2011), для которых нормой становится дистальное положение микротрубочек и формула аксонемы 9+1 (Childiidae) либо аксиальное положение и формула 9+0 (Convolutidae).

В пределах типа Plathelminthes положение свободных микротрубочек остается кортикальным, а жгутики либо редуцируются (у базальных таксонов Catenulida и Macrostomorpha – Rieger, 1978; Willems et al., 2009), либо приобретают формулу аксонемы 9+«1», являющуюся синапоморфией макротаксона Trepaxonemata (Ehlers, 1985). Следующий этап эволюции плоских червей – выделение группы Neoophora, характеризующейся дифференцировкой женской половой системы на гермарий и вителлярий. Согласно современным филогенетическим представлениям (Rohde, 1990; Carranza et al., 1997), базальное

положение среди неоофор занимает отряд Proseriata. Следующим важным этапом эволюции сперматозоидов плоских червей является олигомеризация митохондрий и цитоплазматических включений, проявляющаяся у представителей таксона Eulecithophora (Sopott-Ehlers, 1997), включающего оставшиеся группы «турбеллярий» Tricladida и Rhabdocoela (в т.ч. Kalyptorhynchia) и паразитических плоских червей (Neodermata). Наконец, в спермиях трикладид как наиболее высокоорганизованного отряда «турбеллярий» происходит реорганизация ядерного аппарата, заключающаяся в формировании четырех волокнистых хроматиновых тяжей. Паразитические плоские черви, характеризующиеся особым неодерматным типом спермиогенеза (Justine, 1991; Kornakova, Joffe, 1999; Littlewood et al., 1999a, b), традиционно филогенетически выводились из прямокишечных турбеллярий (Ehlers, 1985). Однако последние морфологические и молекулярно-генетические данные позволяют оспорить их близкое родство (Joffe, Kornakova, 1998; Корнакова, Пугачев, 2009). В частности, в ходе данного исследования обнаружены новые ультраструктурные особенности, по нашему мнению, сближающие трематод с трикладами.

В заключение хотелось бы проанализировать с филогенетических позиций обнаруженные черты сходства Acoelomorpha и Plathelminthes, в настоящее время считающихся неродственными таксонами (Ruiz-Trillo et al., 1999; Cannon et al., 2016). На основе литературных и собственных данных к таким базовым общим чертам можно отнести кортикальное положение свободных микротрубочек, «турбеллярный» тип спермиогенеза и рекапитуляцию предковых особенностей на клеточном уровне в ходе спермиогенеза. По нашему мнению, можно предложить два различных варианта объяснения появления упомянутых общих черт.

1. Указанные особенности могут являться синапоморфиями единого таксона, что позволяет усомниться в общепринятом в настоящее время «раздельном» филогенетическом положении ацеломорф и плоских червей.

2. Указанные черты сходства могут являться симплезиоморфиями, независимо унаследованными двумя неродственными таксонами от общего предка Bilateria. В этом случае можно допустить, что общий предок Bilateria

обладал нитевидными (модифицированными или аберрантными) сперматозоидами с парой инвертированных жгутиков с формулой аксонемы 9+2, кортикальными микротрубочками и «турбеллярным» типом спермиогенеза, а также вероятно наружно-внутренним или внутренним осеменением.

Несомненно, для окончательного решения этого вопроса необходимы дополнительные морфологические и молекулярно-генетические исследования обеих упомянутых групп низших билатерий.

ВЫВОДЫ

1. Мужские половые клетки Acoela и плоских червей характеризуются как сходными чертами строения («турбеллярный» тип спермиогенеза, изначальное кортикальное положение свободных микротрубочек и хаотичное распределение включений в сперматидах), так и различиями (формула аксонемы). В отличие от Acoela, для сперматозоидов Plathelminthes характерно объединение гранул в цепочку, уменьшение количества митохондрий путем слияния, образование сложных комплексов из митохондрий и гранул.

2. Основное направление эволюции сперматозоидов Acoela заключается в смене расположения свободных микротрубочек (с кортикального на аксиальное) и формулы аксонем (с 9+2 на 9+0). Способность яйцеклеток Acoela к фагоцитозу может свидетельствовать о низком уровне организации этого таксона и о его обособленном положении в животном царстве.

3. Эволюционные изменения спермиев Plathelminthes затрагивают в первую очередь локомоторный аппарат (характер инкорпорирования жгутиков, изменение формулы аксонем и конфигурации свободных микротрубочек), затем происходит олигомеризация митохондрий и дополнительных включений и, наконец, для наиболее специализированных таксонов характерна реорганизация ядерного аппарата.

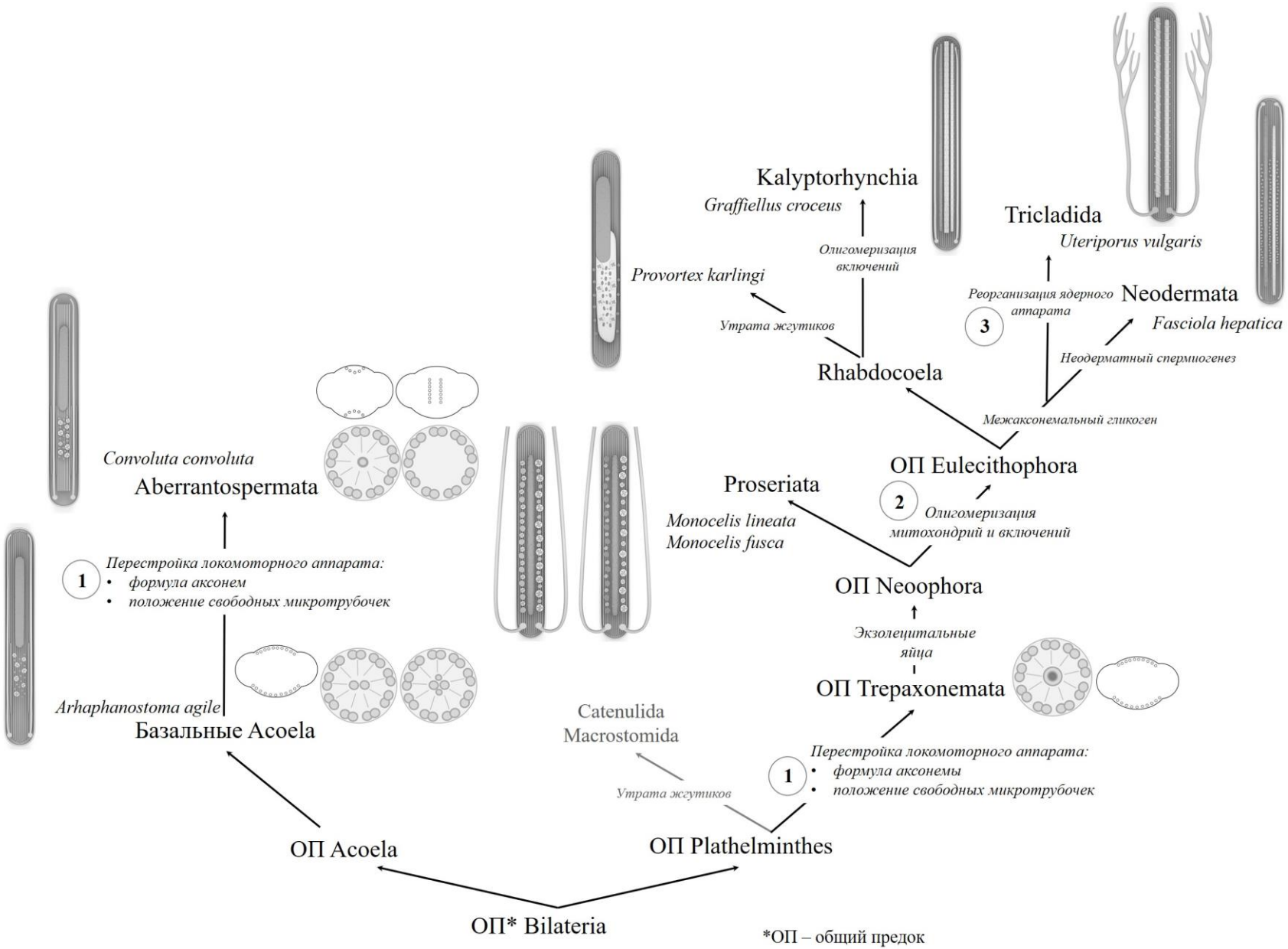

Рисунок 3. Реконструкция основных этапов эволюции половых клеток Acoela и Plathelminthes

4. В процессе спермиогенеза как Acoela, так и Plathelminthes проявляются особенности, характерные для предковых форм и представляющие собой яркие примеры рекапитуляции на клеточном уровне. Примером рекапитуляции предковых особенностей в ходе оогенеза может являться присутствие автосинтетического желтка в яйцеклетках неоофорных плоских червей.

5. Ультраструктура сперматозоидов близких видов из архаичных групп плоских червей (к примеру, двух видов просериат из рода *Monocelis*) характеризуется видоспецифическими отличиями, в то время как для спермиев высокоорганизованных отрядов (Tricladida) характерна консервативность строения.

6. Сходство ультраструктурных особенностей спермиев и спермиогенеза трикладиды *Uteriporus vulgaris* и трематоды *Fasciola hepatica* (слияние многочисленных митохондрий в одну, наличие межаксонемального гликогена) свидетельствуют об эволюционной преемственности морфологических признаков у свободноживущих плоских червей и неодермат и о возможной филогенетической близости двух данных групп.

7. В некоторых таксонах плоских червей крайняя специализация локомоторного аппарата спермиев проявляется в полной утрате жгутиков. В случае прямокишечной турбеллярии *Provortex karlingi* их функции, вероятно, частично принимает на себя перинуклеарное скопление гранул.

8. Состав и расположение включений наряду с другими ультраструктурными признаками яйцеклеток турбеллярий и особенностями оогенеза специфичны в пределах каждого отряда и могут служить филогенетическими индикаторами.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК и системы цитирования Scopus и Web of Science.

1. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура половых клеток и их формирование у бескишечной турбеллярии *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е.

Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин, А. И. Голубев // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2012а. – Т. 154, кн. 2. – С. 129–138.

2. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура половых клеток морской трикладиды *Uteriporus vulgaris* (Tricladida: Maricola) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин, А. И. Голубев // Зоологический журнал. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 401–411.

3. Шафигуллина, Е. Е. Ультраструктура безжгутиковых сперматозоидов прямокишечной турбеллярии *Provortex karlingi* (Neorhabdocoela: Dalyellioida) / Е. Е. Шафигуллина, Г. Р. Газизова, Я. И. Заботин // Зоологический журнал. – 2015. – Т. 94. № 11. – С. 1243–1248.

4. Shafigullina, E.E. Main pathways of evolution of spermatozoa of Acoelomorpha and free-living Plathelminthes / E. E. Shafigullina, Y. I. Zabotin // Invertebrate Zoology. – 2017a. – Vol. 14, № 1. – P. 59–66.

Прочие публикации.

1. Газизова Г. Р. Ультраструктура половых клеток *Provortex karlingi* (Turbellaria; Rhabdocoela) / Г. Р. Газизова, И. Д. Казилова, Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // 50-й Юбилейная Международная научно-студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». Материалы конференции. – Новосибирск, 2012. – С. 222.

2. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура сперматозоидов и сперматогенез *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин, А. И. Голубев // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского университета 2010 г.: сборник статей. – Казанский университет, Казань, 2010а. – С. 26–29.

3. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура сперматозоидов и особенности сперматогенеза бескишечной турбеллярии *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин, А. И. Голубев // III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-

биологов «Симбиоз-Россия 2010». Сборник тезисов. – Нижний Новгород, 2010b. – С. 41.

4. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура половых клеток и их формирование у бескишечной турбеллярии *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // II Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» к 105-летию со дня рождения академика А.В. Иванова. Материалы конференции. – Санкт-Петербург, 2011a. – С. 366–369.

5. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Спермиогенез бескишечной турбеллярии *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2011». Тезисы докладов. – Москва, 2011b. – С. 130.

6. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Особенности спермиогенеза у бескишечной турбеллярии *Convoluta convoluta* (Acoela) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // XLIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». Сборник тезисов. – Новосибирск, 2011c. – С. 262.

7. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультратонкое строение сперматозоидов турбеллярии *Uteriporus vulgaris* (Tricladida: Maricola) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // 50-я Юбилейная Международная научно-студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». Материалы конференции. – Новосибирск, 2012b. – С. 24.

8. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура сперматозоидов и спермиогенез неоофорных турбеллярий (Turbellaria, Neoophora) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // Международная научно-практическая конференция «Экология, эволюция и систематика животных». Материалы конференции. – Рязань, 2012c. – С. 155–156.

9. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультратонкое строение яйцеклеток морской турбеллярии *Uteriporus vulgaris* (Tricladida: Maricola) // Е. Е. Чернова

(Шафигуллина), Я. И. Заботин / V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012». Материалы конференции. – Тверь, 2012d. – С. 406–407.

10. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Ультраструктура сперматозоидов двух видов турбеллярий семейства Monocelididae (Turbellaria: Proseriata) / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы биологии и биологического образования в педагогических вузах». Материалы конференции. – Новосибирск, 2013a. – С. 22–23.

11. Чернова (Шафигуллина), Е. Е. Особенности спермиогенеза Kalyptorhynchia и проблемы эволюции половых клеток у паразитических плоских червей / Е. Е. Чернова (Шафигуллина), Я. И. Заботин // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. Материалы докладов научной конференции. – Москва, 2013b. – С. 414–416.

12. Шафигуллина, Е. Е. Основные пути эволюции сперматозоидов свободноживущих плоских червей / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // Материалы школы для молодых специалистов и студентов к 110-летию со дня рождения академика А. В. Иванова «Современные проблемы эволюционной морфологии животных». – Санкт-Петербург, 2016a. – С. 71–72.

13. Шафигуллина, Е. Е. Сравнительная ультраструктура сперматозоидов Kalyptorhynchia и Trematoda в свете проблем эволюции паразитических плоских червей / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // Труды Центра паразитологии Ин-та проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Т. XLIX: Фауна и экология паразитов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016b. – С. 203–205.

14. Шафигуллина, Е. Е. Ультраструктурные особенности спермиогенеза *Fasciola hepatica* L., 1758 (Trematoda: Fasciolidae) / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // VIII Международная заочная конференция чтения памяти профессора И.И. Барабаш-Никифорова «Современные проблемы зоологии и паразитологии». Сборник статей. – Воронеж, 2016c. – С. 311–315.

15. Шафигуллина, Е. Е. Ультраструктура сперматозоидов турбеллярии *Provortex karlingi* (Neorhabdocoela: Dalyellioida) Белого моря / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // Материалы XIII Всероссийской конференции с международным участием «Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 249–251.

16. Шафигуллина, Е. Е. Ультраструктурные изменения митохондрий в ходе спермиогенеза печеночной двуустки *Fasciola hepatica* L., 1758 / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция (15–19 октября 2018 г.) – Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, 2018a. – С. 261.

17. Шафигуллина, Е. Е. Ультраструктура женских половых клеток неоофорных турбеллярий в филогенетическом аспекте / Е. Е. Шафигуллина, Я. И. Заботин // Зоология беспозвоночных – новый век. Материалы конференции, посвященной 160-летию Кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (19-21 декабря 2018 г.). – Москва, 2018b. – С. 130.

18. Shafigullina, E. E. Main pathways of evolution of spermatozoa of Acoelomorpha and free-living Plathelminthes / E. E. Shafigullina, Y. I. Zabotin // 4-ый Международный конгресс по морфологии беспозвоночных (4th International Congress on Invertebrate Morphology), г. Москва, 18-23 августа 2017 г. – М.: Издательство «Перо», 2017b. – С. 49.