

Никола Ковачевић и Љубиша Ракић

**НЕКЕ ЕКОФИЗИОЛОШКЕ ОСОБЕНОСТИ ГАСТРОПОДА
APLYSIA DEPILANS L.***

ECOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GASTROPOD APLYSIA
DEPILANS L.

Извод

Морски гастропод *Aplysia depilans* L. широко је кориштен објекат неуробиолошких истраживања захваљујући карактеристичној грађи нервног система који садржи изузетно велике (гигантске) неуроне величине од 500—1000 μ . Ови организми појављују се сезонски у приобалном подручју у локалитетима јужног Јадрана од априла до октобра. Појављивање *Aplysia depilans* у овом периоду у природним стаништима показује типичне циркадијалне варијације — највећи број организама нађен је у вечерњим и ноћним часовима а изузетно мали број у каснијим јутарњим и дневним часовима. Сличне циркадијалне варијације запазили смо у лабораторијским условима — акваријуму који симулира микроеколошке услове природног станишта.

Synopsis

The sea hare, *Aplysia depilans*, an opisthobranch mollusk, is widely used for neurophysiological and behavioral experiments. One reason for that is the organization of its nervous system which is made up of giant nerve cells. They have been sighted seasonally (from April to October) along the coast of the south Adriatic. During this period, *Aplysia depilans* in its marine environment exhibits a clear circadian cycle — „sleeps and wakes” with a circadian cycle (similar to our own) — the majority might be seen during the dark period, while they disappear during the light hours.

* Овај рад је финансиран средствима СИЗ-а за научне дјелатности СР ЦГ и Републичке заједнице за науку СР Србије.

The long-term observations performed on captured *Aplysia* have revealed the preservation of the circadian variations that underline behaviors („sleep and waking”, reproductive cycles, periodic feeding) in laboratory conditions that simulate natural marine environment.

УВОД

Последње деценије, морске гастроподе, посебно врсте рода *Aplysia*, врло су широко коришћене као објекат истраживања у целуларној неуробиологији с циљем да се успостави веза између функције идентификованих неурона у ганглијама ових организама и понашања (Strumwasser, 1973, Frazier et al, 1967). Ови организми такође су значајни у изучавању развића нервног система и неуралне контроле понашања (Kupferman и Kandel, 1969). То је релативно прост Гастропод који садржи око 10 000 нервних ћелија (Kandel et al., 1967), од којих су неке изузетно велике (500—1000 μ) те се користе за микроектодна интрацелуларна регистровања.

Бројне студије на изолованим нервним ганглијама ових организама јасно су показале постојање пластичних промјена у појединачним нервним ћелијама (Kandel, 1974), које би могле да имају везу са промјенама у понашању интактних организама, укључујући форме учења (Lickey, 1968; Ковачевић и Ракић, 1974). Посебно интересантна запажања у понашању ових организама у затвореном систему акваријумских услова истичу постојање циркадијалног периодичитета у функцији изолованих неурона (идентификовани неурони у абдоменалном ганглиону, изолованом оку и неуросекреторни неурони *Aplysia-e*) и општој локомоцији (Strumwasser, 1973; Kupferman и Kandel, 1968). Циркадијални ритам у електричним активностима изолованих неурона подлијеже сезонским варијацијама, нарочито у зависности од температуре (Lickey, 1969). Сезонске промјене имају одраза и у продукцији индубилних материја у ћелијама кружно постављеним око ганглија *Aplysia-e*, које доводе до активације овогенезе (Strumwasser et al., 1969). Егзактније неуробиолошке студије и разумјевање низа феномена изолованих нервних ћелија захтијевају боље познавање базичних биолошких, еколошких и екофизиолошких карактеристика ових организама, који су, на жалост, релативно слабо проучени а студије се претежно односе на опште услове исхране и дужине живота (Carefoot, 1967; 1967a).

Да бисмо добили податке о екофизиолошким карактеристикама *Aplysia*, вршили смо вишегодишња сезонска и циркадијална посматрања ових организама у локалитетима Јужног Јадрана, уз паралелна лабораторијска посматрања на моделу симулације природног станишта.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИКА

У овом раду вршили смо посматрање *Aplysia depilans* у два локалитета јужног Јадрана — Будва и Дубровник и у лабораторијским условима — акваријуму, који је симулирао извјесне карактеристике природног станишта.

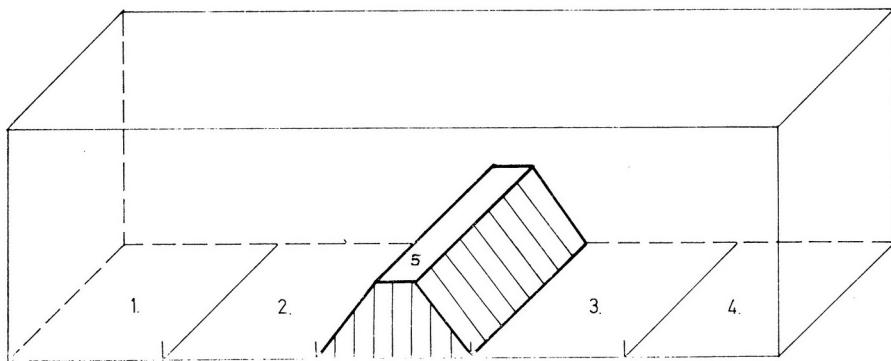
Локалитет Будва обухватао је област старог пристаништа, источне експозиције. Уз вјештачки бетонски лукобран налази се плитко каменито дно 0,1—1,5 m дубине, обрасло мјестимично са *Ulva lactuca* и *Enteromorfa* sp., а пружа се под углом у дубину луке достижући на дистанци 10 m од обале дубину од 5—6 m. Средња мјесечна температура воде износи од 11,1—14,6° С за период децембар—април, односно од 17 до 26,1° С у периоду мај—новембар за три посматране године. Салинитет мора варирао је током године од 32,2 до 39,10‰. Вода у луци је загађена градском канализацијом. Ради одређивања степена загађености вршили смо повремене хемијске анализе морске воде. Примјера ради наводимо хемијску анализу у јулу 1977. године, када су вршена и сезонска и циркадијална посматрања *Aplysiae*:

рН	8,2
Амонијак mg/l N	0,15
Нитрат mg/l NO ₃	0,45
Хлорид mg/l Cl	21,275
Потрошња калијумперманганата mg/l KMNO ₄	70,11
Фосфор mg/l P	0,060
Сулфат mg/l SO ₄	2,893
Бикарбонат mg/l HCO ₃	160,2
Алкалинитет m val/l	2,53
Цјелокупна тврдоћа dH°	392°
(у њемачким степенима)	
Карбонатна тврдоћа dH°	7
Некарбонатна тврдоћа	385°
Калцијум mg/l Ca	440
Магнезијум mg/l Mg	1,447
Силицијум mg/l SiO ₂	10,6
Суви остатак mg/l	37 872

Локалитет Дубровник обухвата област источног дијела луке и Грушког залива, западне експозиције. Уз потпорни зид обале дуж луке налази се такође плитко каменито дно (0,10—1,5 m) обрасло са *Ulva lactuca* које се под оштрим углом пружа ка цен-

тру залива гдје на 20—25 m од обале досеже дубину од 7—10 m. Вода у заливу исто је као и у Будванском пристаништу загађена градском канализацијом, чија се средња мјесечна температура креће од 12,4 до 15,1° C за период децембар—април, односно од 17,8 до 26,7° C за период мај—новембар током три посматране године. Хемијски параметри у љетним мјесецима слични су налазу у Будванском локалитету. Салинитет се кретао од 31,2 до 38,80‰.

Посматрања *Aplysiae* у наведеним локалитетима вршена су у периоду јануар—децембар а број организама у простору 5×3 дужна метра обале и мора. У јулу 1976, 1977. и 1978. године на истим локалитетима вршили смо идентична испитивања током 24-часовног периода (од 0—24 часа). Просјечни број организама одређиван је пребројавањем видљивих *Aplysia* на наведеном простору морског дна 5×3 m, уз употребу вјештачког освјетљавања у вечерњим и ноћним часовима. Акваријумска испитивања вршена су у адаптираном акваријуму како би симулирали природне услове станишта. Акваријум је био дугачак 375 cm, широк 40 cm, а висок 70 cm и састојао се из четири одјељка: муљ, пјесак, шљунак и *Ulva lactuca*, што је опонашало микроеколошке услове природног станишта (слика 1).



Сл. 1. Шематски профил базена

1 — муљ; 2 — пјесак; 3 — шљунак; 4 — храна (*Ulva lactuca*); 5 — преграда

Fig. 1. Schematic profile of the pool

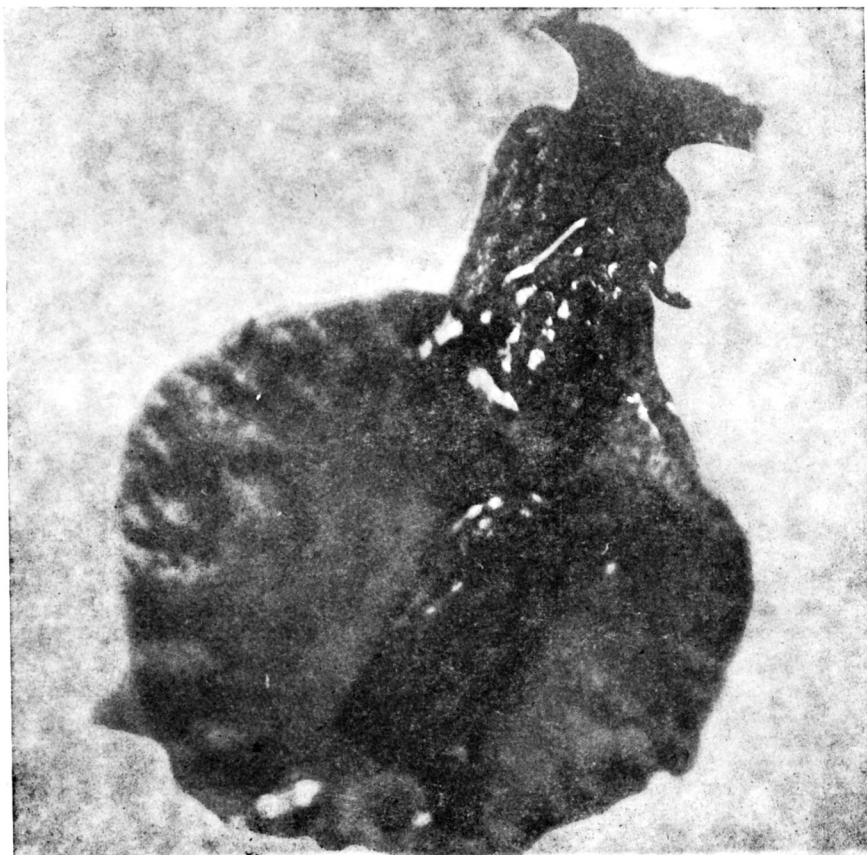
1 — mud; 2 — sand; 3 — gravel; 4 — food (*Ulva lactuca*); 5 — barrier

Висина воде у базену износила је 50 cm, а између одјељка пјеска и шљунка налазила се бетонска преграда висине 30 cm која је омогућавала прелаз *Aplysia* у друге одјељке а уједно симулирала уобичајене природне препреке на морском дну.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

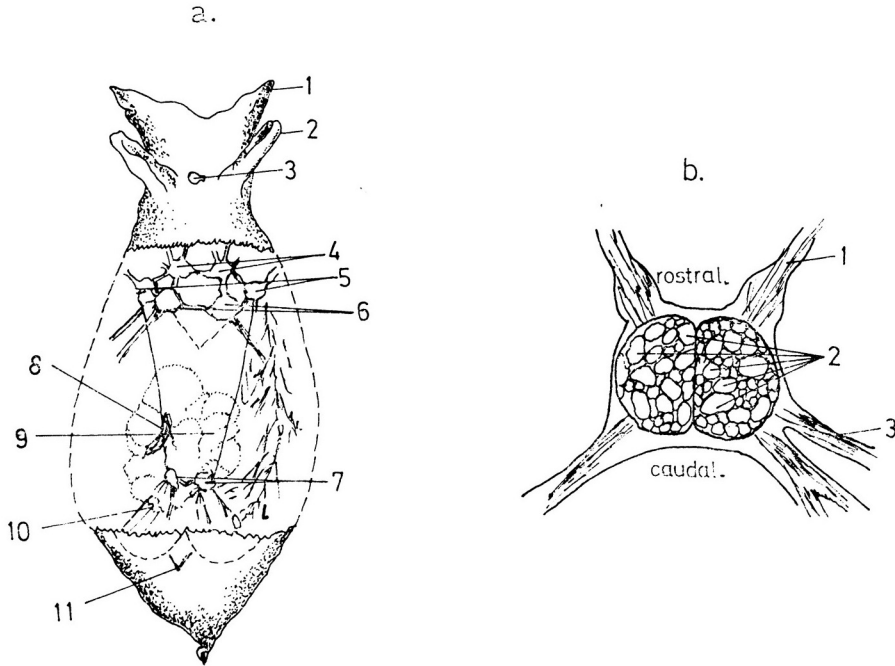
ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ *Aplysia depilans*

Aplysia depilans кестењасто је зеленкасте до смеђе боје са бљескасто рићим пјегама или црнкастим пругама (жилицама) (слика 2). Тентакуле су кратке и задебљане. Параподије су распоређене према напријед и спојене међусобно на лећној страни у постериорној регији. Животиња плива ријетко и споро, њишући главом напријед и уз помоћ бочних пераја и то обично када је

Сл. 2. *Aplysia depilans* L.Fig. 2. *Aplysia depilans* L.

узнемирана, иначе пузи, доста споро. *Aplysia depilans* просјечне је дужине до 25 см. У Которском и Улцињском заливу наћени су у септембру изузетно велики примјерци ове врсте, и до 45 см

дужине, тежине 1 180 грама, са распоном бочних пераја 34 см. На локалитетима Буаве и Дубровника нису нађени тако изузетно велики примјерци. Дужина је *A. depilans* у овим локалитетима 15—25 см, а тежина од 150—300 г.



Сл. 3. а) Схематски приказ нервног система *Aplysia depilans*; б) изглед дорзалне стране ганглије са гигантским неуронима

а) 1 — тентакуле; 2 — ринофоре; 3 — челјусти; 4 — церебрална ганглија; 5 — плеурална ганглија; 6 — педална ганглија; 7 — абдоминална ганглија; 8 — шкољка; 9 — шкрге; 10 — сифон; 11 — параподија; б) 1 и 3 — нервне везе; 2 — гигантски неурон

Fig. 3. а) Schematic representation of the nervous system of *Aplysia depilans*; б) Dorsal view of the ganglion with giant neurons

а) 1 — tentacle; 2 — rhinophores; 3 — jaw; 4 — cerebral ganglion; 5 — pleural ganglion; 6 — pedal ganglion; 7 — abdominal ganglion; 8 — mantle shelf; 9 — gills; 10 — siphon; 11 — parapodia; б) 1 and 3 — nerve connections; 2 — giant neurons

Дисекцијом *A. depilans* запажа се њена карактеристична грађа нервног система, која је релативно проста у односу на нервни систем кичмењака, и садржи свега 15—20 000 неурона (само кора великог мозга човјечјег садржи око 20 милијарди неурона). Централни нервни систем *A. depilans* састоји се из 9 ганглија (слика 3а) од којих је свака одговорна за поједину функцију овог организма. Четири парне ганглије симетрично су

распоређене лијево и десно по двије и одговорне су за соматске функције (церебралне, букалне, педалне и плеуралне), а девета непарна — абдоменална, контролише висцералне функције.

Поред централног *Aplysia*, има и периферни нервни систем који, како истичу Bullock и Horidge (1965), Kandell и Spenser (1968), зависно од завршетака нервних влакана, контролише рад појединих дијелова организма. Свака ганглија (слика 3b) садржи просјечно 1 000—2 000 неурона, што је далеко мањи број од ганглија кичмењака. Распоред осталих органа не одступа битно од организације која постоји у других гастропода.

СЕЗОНСКЕ ВАРИЈАЦИЈЕ *Aplysia depilans* У ЛОКАЛИТЕТИМА БУДВЕ И ДУБРОВНИКА

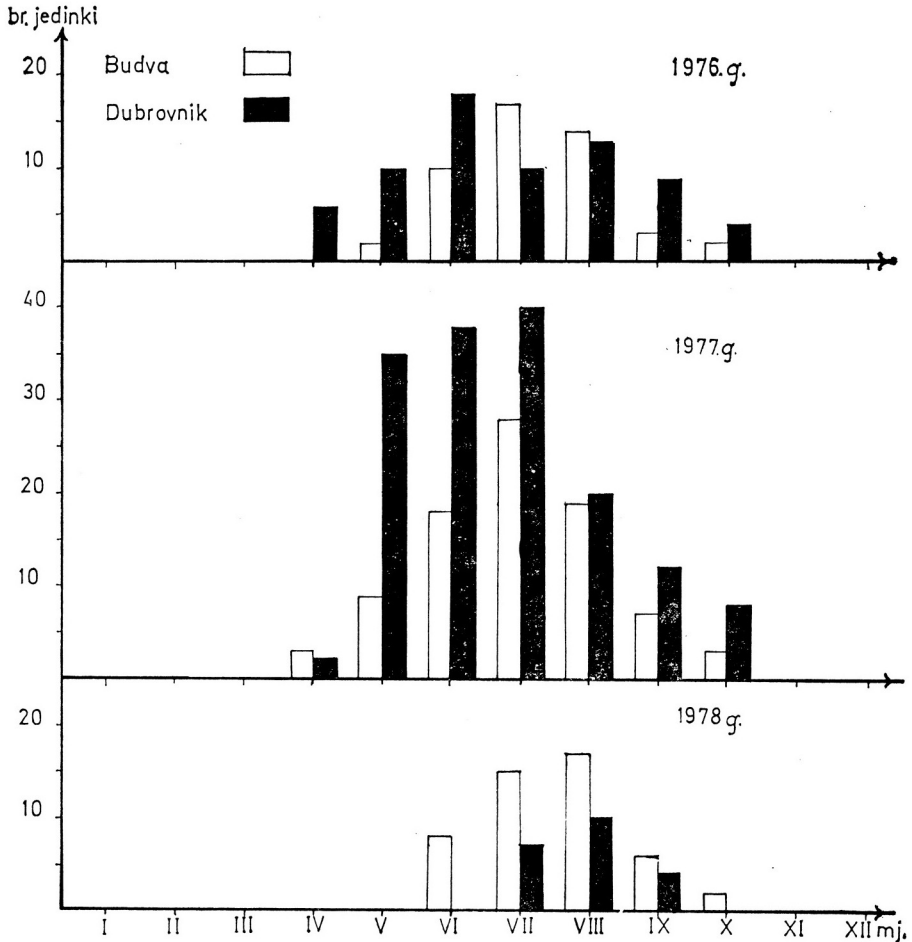
Посматрање *A. depilans* у већем броју локалитета Јужног Јадрана од Дубровачке Ријеке до Улциња, које смо вршили у периоду од 1969. до 1978. пружила су нам могућности да боље сагледамо извјесне еколошке чиниоце везане за ову врсту. У овом раду ограничили смо се само на локалитете: Пристаниште Будве и залива Груж у Дубровнику, гдје смо у дужем временском периоду били у могућности да нађемо сталније присуство ове врсте у току свих година посматрања. Посматрања смо вршили 5—6 пута мјесечно у касним поподневним, вечерњим и раним јутарњим часовима и одређивали, прво, присуство овог организма на овим локалитетима, а затим, њихов број у простору 5×3 m (дужина обале пута ширина мора). Посматрања смо вршили читаве 1976, 1977. и 1978. године од јануара до децембра.

Појављивање *A. depilans* у наведеним локалитетима везано је искључиво за период од краја априла до почетка октобра. Извјесна одступања налазимо у 1978. години, гдје се *Aplysia* први пут појављује тек почетком јуна у локалитету Будве, а почетком јула на локалитетима Дубровника. Средња температура мора у периоду појаве *Aplysia* износила је око 19° С а ишчежавања око 19,5° С. Год. 1978. имала је знатно ниже температуре у мају и јуну, што би могао бити један од узрока одступања од регуларног циклуса појављивања и ишчежавања овог организма 1978. године.

ЦИРКАДИЈАЛНЕ ВАРИЈАЦИЈЕ *Aplysia depilans* У ЛОКАЛИТЕТИМА БУДВЕ И ДУБРОВНИКА

У јулу 1977. године вршили смо посматрање појављивања *Aplysia depilans* у наведеним локалитетима јужног Јадрана по часовима од 1—24^h. За сваки сат унутар 24-часовног циклуса обавили смо од 6—8 посматрања у јулу и на Табели 1 приказали средњи број појављивања организма по сатима.

Највећи број организама на посматраном простору (5×3) налазили смо у периоду од 20—24^h, а нешто мањи од 18—20 и 1—6^h, док у периоду од 7—16 број је битно редукван или пак



Граф. 1. Средњи број јединки *A. depilans* у простору 5×3 m по мјесецима, годинама и локалитетима

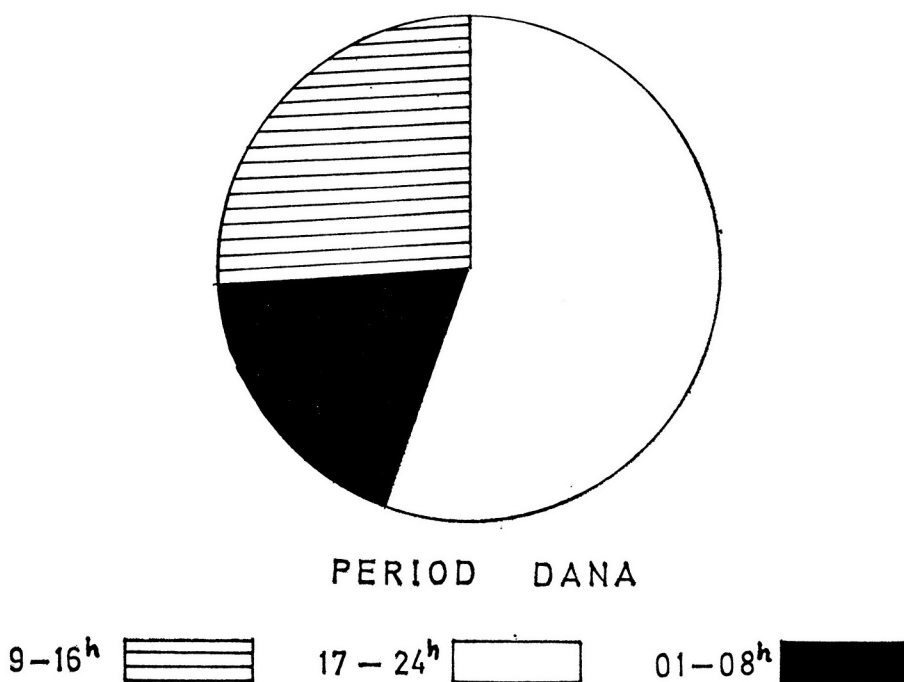
Graf. 1. The means number of the specimens of *A. depilans* in the square 5×3 m in months, years and localities

њихова појава изостаје. Период од 7—16^h вријеме је максималне освијетљености у јулу мјесецу и *Aplysia* обично заузима било дубинске просторе или мјеста испод већег камења и других при-

родних и вјештачких заклона, тако да није видљива при обичном посматрању у наведеним локалитетима. Унутар наведених посматрања било је, поред сунчаних, и облачних дана. У облачним данима били смо у могућности да запазимо појаву *A. depilans* током читавог 24-часовног периода, мада и тада знатно више у вечерњим и ноћним сатима. То је разлог што их ми нотирамо у мјесечном просјеку и у периоду од 7—16^h.

ЦИРКАДИЈАЛНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ *Aplysia depilans* У АКВАРИЈУМСКИМ УСЛОВИМА

На табели 2 приказано је вријеме које *Aplysia depilans* проведе у појединим одјељењима акваријума као симулаторима микроеколошких услова природног станишта. Након што је *A. depilans* држана 7 дана ради прилагођавања условима акваријума у овом систему, приступили смо посматрању њеног кретања унутар наведеног система по сатима (од 1—24) током 96 часова.



Граф. 2. Кружни хистограм боравка *Aplysia depilans* на храни у 24-часовном периоду

Graph. 2. The spherical histogram of the stay of *Aplysia depilans* on food within 24-hours period

Таб. 1. — Циркадијалне варијације *A. deripans* по локалитетима (бројеви означавају средњи број јединки на простору 5×3 m обале)

Tab. 1. — Circadian variation of *A. deripans* in the localities (The numbers show the mean number of specimen in the square 5×3 m of the coast)

Локалитети	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Будва	16	10	8	12	14	19	10	4	2	—	—	—	—	1	—	—	4	8	20	22	21	23	20	18
Дубровник	17	11	10	11	10	18	20	19	3	3	2	—	3	4	2	1	3	18	28	20	24	21	19	25

Таб. 2. — Кретање *A. depilans* у симулираном систему акваријума. I — мучь; II — пијесак; III — шљунак; IV — храна (*Ulva lactuca*). Бројеви означавају вријеме у часовима које је *A. depilans* провела у појединим одјелима акваријума унутар 96-ог периода посматрања.

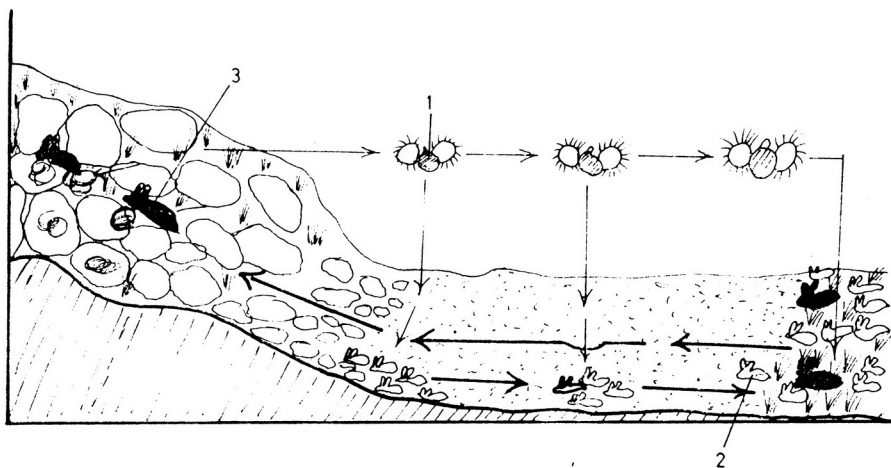
Таб. 2. — The movement of *A. depilans* in simulated system of the aquarium. I — mud; II — sand; III — gravel; IV — food (*Ulva lactuca*). The numbers show the time in hours during which the *A. depilans* stay in different compartments of the aquarium within 96-hours period of the observations.

ОДЈЕЛЦИ COMPARTEMENTS	ЧАСОВИ — HOURS																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
I	1	1	2	—	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	—	2	1	—	—	1	—	—
II	1	1	2	3	1	1	1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
III	1	1	2	1	1	1	—	1	1	—	1	1	1	2	2	1	1	2	—	—	—	—	—	—
IV	2	2	1	1	—	1	1	—	1	1	1	—	—	—	1	1	2	3	2	3	3	3	3	2

Добијени резултати показују да је у вечерњим часовима, од 17—24^h, унутар испитиваног периода од 96 сати *A. depilans* највећи дио времена провела у одјељењу I (храна) — 53 сата. У истом одјељку од 0—8^h провела је само 18 сати, а у периоду од 9—16^h 25 часова (графикон 2). Супротно у периоду највеће природне осјетљивости она највише времена проводи у одјељењима гдје није присутна храна.

Добијени резултати посматрања *Aplysia depilans* у наведеним локалитетима природних станишта јужног Јадрана (Будва, Дубровник) истичу сезонски карактер њиховог појављивања — појаве овог организма у испитиваним стаништима у периоду април—мај, а ишчезавање у септембру—октобру, што је резултат сезонских, климатских, прије свега температурних услова, од којих зависи развој одговарајуће флоре за исхрану *Aplysiae*. Запажања других аутора (C a r e f o o t -a, 1967a, 1967b) о *Aplysia californica* и *Aplysia punctata* указује да животни вијек ових организама износи око 12—18 мјесеци. Наша посматрања *Aplysia depilans* у сагласности су са овим налазима с тим што се разлике истичу у времену појављивања јувенилних форми и периоду парења. *Aplysia californica* (F a u, 1973) појављује се у јувенилном облику у заливу Сан Франциска и Калифорниском заливу у септембру—октобру, расте током зиме и прољећа, сазријева и пари се у периоду од јуна до децембра. Јувенилне облике *A. depilans* у региону јужног Јадрана налазили смо у периоду од маја до августа, парење се обавља у периоду од маја до краја септембра, а примјерци највеће тежине нађени су у јулу, што наводи на претпоставку да је животни вијек ове врсте између 1,5 и 2 године. Упоредна посматрања *A. depilans* у природним стаништима и акваријуму показују да се парење одиграва у дијелу гдје је присутна храна (*Ulva lactuca* прије свега). Оплођена јаја ношена су затим морском струјом ка дубини залива тако да се даље развиће, сазријевање и раст одигравају највјероватније у дубљим просторима залива (муљ и пијесак). То пружа могућност претпоставке да у зимском периоду оплођена јаја и јувенилне јединке заузимају простор најдубљих области залива, а да се порастом температуре мора усмјеравају према приобалном подручју, каменитој обали и храни (*Ulva lactuca*). Схематски ову претпоставку изложили смо на слици 4.

Циркадијални ритам овог организма у природном станишту и акваријумским условима опонаша у краћој временској скали сезонско кретање. У оптималним сезонским условима (јуни—септембар) *A. depilans* унутар 24-часовног периода креће се од хране до скровитих дијелова станишта (камен, пјесак, муљ) испољавајући карактеристичну циркадијалност — налази се у региону хране у вечерњим а у региону изван хране у дневним часовима, тј. периоду максималне освијетљености. Описани циркадијални



Сл. 4. Схематски приказ профила станишта *A. depilans*
 1 — оплобена јаја; 2 — јувенилне јединке; 3 — одрасле јединке

Fig. 4. The schematic representation of the habitats of *A. depilans*
 1 — fertilized eggs; 2 — juvenile specimens; 3 — adult specimens

ритам понашања *A. depilans* у овом раду је у сагласности са понашањем електричне активности идентификованих неурона њених ганглија у систему *in vitro* (Strumwasser, 1970) и изолованог ока (Jacklet 1972) као и способности за изграђивање условних рефлекса (Ковачевић и Ракић, 1974) што представља прилог за разумијевање екофизиолошких карактеристика овог организма.

ЛИТЕРАТУРА

- Bullock, T. H. and Horridge, G. A. (1965): Structure and Function in the nervous Systems of Invertebrates. Vol. II — W. H. Freeman and Company San Francisco and London.
- Carefoot, T. H. (1967): Studies on a sublittoral population of *Aplysia punctata* Cuvier. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 47 : 335—350.
- Carefoot, T. H. (1967a): Growth and nutrition of three species of opisthobranch molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 21 : 627—652.
- Fay, R. C. (1973): Personal communication-Pacific Bio-Marine Supply Company, O. O. Box 536, Venice, California — USA.
- Frazie, W. T., Kandel, E. R., Kupfermann, I., Waziri, R. and Coggeshall, R. E. (1967): Morphological and functional properties of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia Californica*. *J. Neurophysiol.*, 30 : 1288—1351.
- Jacklet, J. W. (1969): A circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from the isolated eye of *Aplysia*. *Science* 164 : 562—564.

- Jacklet, J. W. (1972): Circadian locomotor activity in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 79 : 325—341.
- Kandel, E. R., Frazier, W. T. and Coggeshall, R. E., (1967): Oposite synaptic actions mediated by different branches of an identifiable interneurons in *Aplysia*. *Sciences*, 155 : 346—349.
- Kandel, E. R. and Spencer, W. A. (1968): Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol. Rev.* 48 : 65—134.
- Ковачевић, Н. и Ракић, Љ. (1974): Спонтано и условљено понашање *Aplysia depilans* у функцији циркадијалног ритма. IV Конгрес Друштва физиолога Југославије — Сарајево.
- Kupfermann, I. (1968): A circadian locomotor rhythm in *Aplysia californica*. *Physiol. and Behavior* 3 : 179—181.
- Kupfermann, I. K. i Kandel, E. R. (1969): Neural Controls of a Behavioral Responce Mediated by The Abdominal ganglion of *Aplysia*. *Science* 164 : 847—850.
- Lickey, M. E. (1968): Learned behavior in *Aplysia vaccaria*. *J. Comp. and Physiol. Psychol.* 66,3 : 712—718.
- Lickey, M. E. (1969): Seasonal modulation and non-24-hour entrainment of a circadian rhythm in a single neuron. *J. Comp. and Physiol. Psychol.* 68 : 9—17.
- Strumwasser, F. (1973): Neural and humoral factors in the temporal organisation of Behavior. *The Physiologist*, 16,1 : 9—42.
- Strumwasser, F., Jacklet, J. W. and Alvarez, B. R. (1969): A seasonal rhythm in the neural extract induction of behavioral egg-laying in *Aplysia*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 29 : 197—206.

ECOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GASTROPOD APLYSIA DEPILANS L.

by

Nikola KOVAČEVIĆ and Ljubiša RAKIĆ**

Summary

The marine Gastropod *Aplysia depilans* is a widely used subject in neurobiological research owing to the distinctive structure and organisation of the nervous system which contains extremely large neurons, the size of 500—1000 μ .

Observing these organisms in the locality of the south Adriatic during the period 1969—1978, we noticed that they appear in the coastal regions between April and October. Examining the appearance of the *Aplysia depilans* within a 24 hour period, in a certain area of natural surroundings, we found that the greatest number of species is found between 18—24 hours, a somewhat smaller number between 1 and 6 hours and an exceptionally small number on cloudy days, between 7—16 hours.

* Address: Brain Research Laboratory, PO Box 80, 81330 Kotor, Yugoslavia.

In an attempt to simulate the microecological conditions of the natural surroundings in an aquarium and to test the above stated circadian variations, we observed that the *Aplysia depilans* show characteristic behaviour which follows the circadian rhythm. During the period between 17 and 24 hours, the longest amount of time is spent in the part where food is stored, while in the other period of the 24 hours, where food is not stored (gravel, mud, sand).

Comparative research in natural surroundings and aquariums shows that mating takes place in the part present with food. The fertilized eggs are carried by sea currents inward to the bay so the further development, maturing and growth is carried on most probably in the deeper areas of the bay (mud and sand).

Thus the assumption can be that in the winter period fertilized eggs and juvenile specimens occupy the deepest areas of the bay and with the increase of temperatures more in the direction of coastal regions.

