

УДК 594.124:591.3(262.5)

**МЕЙОЗ, ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И ЛИЧИНОЧНОЕ РАЗВИТИЕ *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BIVALVIA, ARCIDAE) ИЗ ЧЁРНОГО МОРЯ****А. В. Пиркова**

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины,  
пр. Нахимова, 2, Севастополь, 99011 Украина  
E-mail: maricultura@mail.ru

Получено 5 мая 2011

Принято 10 ноября 2011

**Мейоз, эмбриональное и личиночное развитие *Anadara inaequalvis* (Bivalvia, Arcidae) из Чёрного моря. Пиркова А. В.** — Рассмотрено развитие двусторчатого моллюска анадара, *Anadara inaequalvis* (Bruguière, 1789), недавнего вселенца в Чёрное море. Вымет яйцеклеток диаметром  $52,5 \pm 1,67$  мкм происходил на стадии диакинеза профазы мейоза, а оплодотворение — на стадии метафазы I. На метафазной пластинке — 18 бивалентов длиной 2,3–11,2 мкм. Установлена продолжительность стадий мейоза, эмбрионального и личиночного развития при температуре воды 25 °С. Представлены микрофотографии личинки на стадии велигера, структуры раковины и замка, даны промеры личинок, описано строение провинкулюма.

Ключевые слова: Bivalvia, Arcidae, *Anadara inaequalvis*, мейоз, эмбриональное развитие, велигер, провинкулюм, Чёрное море.

**Meiosis, Embryonic, and Larval Development of *Anadara inaequalvis* (Bivalvia, Arcidae) Taken from the Black Sea. Pirkova A. V.** — Development of *Anadara inaequalvis* (Bruguière, 1789) mussel, a colonizer in the Black Sea, is studied. The ova  $52.5 \pm 1.67$   $\mu\text{m}$  were laid at the stage of diakinesis of meiosis prophase, and fertilized at the stage of metaphase I. The duration of meiosis stage, embryonic and larvae development at 25 °C is established, while scrutinizing a metaphase plate of 18 bivalents, measures 2.3–11.2  $\mu\text{m}$ . Microphotos of early veliger, the structure of shell and lock are presented, larvae measurements are given, and the structure of provinculum is described.

Key words: Bivalvia, Arcidae, *Anadara inaequalvis*, meiosis, embryonic development, veliger, provinculum, the Black Sea.

**Введение**

Двусторчатый моллюск *Anadara inaequalvis* (Bruguière, 1789) — недавний вселенец в Чёрное море. За короткое время моллюск распространился в западной части моря (Золотарёв и др., 1987), у побережья Кавказа (Киселева, 1992) и у крымских берегов (Ревков и др., 2002). К настоящему времени *A. inaequalvis* обитает в Чёрном море на различных грунтах на глубине до 20 м, а также заселяет почти все участки Азовского моря (Анистратенко, Халиман, 2006). Вид эвритермный и эвригалинный (Zenetos et al., 2003); выдерживает экстремальные кислородные условия, благодаря герметически закрывающимся створкам и наличию гемоглобина в эритроцитах (Furuta et al., 1977).

Известны параметры роста, возрастной состав и репродуктивный период поселений анадары на шельфе северо-восточной части моря и северокавказского побережья (Sahin, 1999; Чикина и др., 2003). Нерест моллюсков происходил в конце августа — начале сентября при температуре воды выше 20 °С (Чикина и др., 2003). Личинки анадары встречались в планктоне с августа по декабрь, с пиком численности в октябре месяце (Казанкова, 2002). Представлено схематическое изображение великонхи и её провинкулюма (Казанкова, 2002). Однако описание мейоза, эмбрионального и раннего личиночного развития *A. inaequalvis* в литературе отсутствует.

**Материал и методы**

*A. inaequalvis* собирали в садках с гигантскими устрицами, подвешенными на мидийно-устричной ферме в бухте Карантинная (г. Севастополь) на глубине 3–5 м. В качестве производителей были

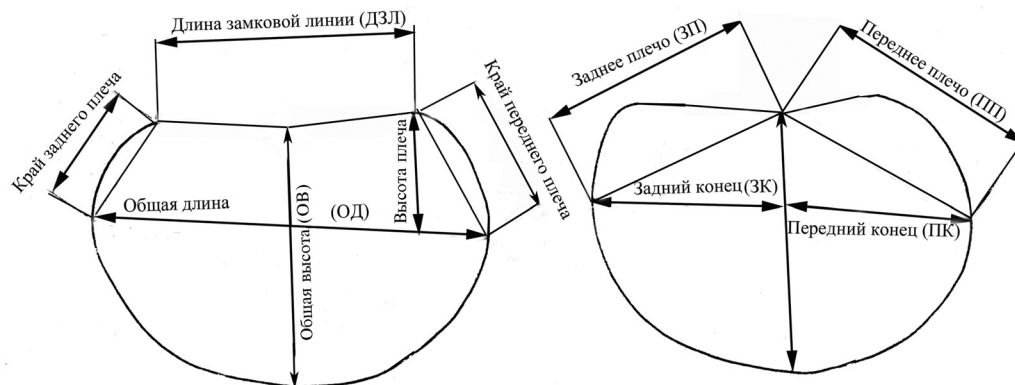


Рис. 1. Измерение продольных профилей у велигеров двустворчатых моллюсков (по: Redfern et al., 1986).  
Fig. 1. Measuring grade profile in veliger bivalve larva (after Redfern et al., 1986).

отобраны 20 половозрелых особей с длиной раковины 19,2–30,4 мм. В августе 2008 г. их нерест стимулировали 0,003 %-ным раствором серотонина [ $C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot H_2SO_4$ ] при температуре воды 25 °С (Найденко, Вараксин, 1987; Пиркова, Ладигина, 2006).

Мейоз изучали на временных давленных препаратах неоплодотворённых и оплодотворённых яйцеклеток. Материал фиксировали в этанол-уксусном фиксаторе (3 : 1). Препараты окрашивали 2 %-ным ацетоорсеином при температуре 37 °С в течение часа и ещё 30 мин. — при 22 °С (Пиркова, 2006). Просматривали по 100 объектов из каждой фиксации при увеличении 400 и 1000 с помощью микроскопа МИКМЕД-6. Стадии развития фотографировали фотокамерой Sony Lens/Optical 3x.

Эмбриональное и раннее личиночное развитие *A. inaequalis* проходило в фильтрованной морской воде с постоянной аэрацией при температуре 25,0 °С и плотности посадки 50 тыс. оплодотворённых яйцеклеток (эмбрионов и личинок) на литр. Их промеры проводили с помощью окуляр-микрометра. Личинок предварительно обездвигивали в парах формальдегида или фиксировали в 4 %-ном растворе формалина на морской воде.

Микроструктуру раковины и детали строения замкового края велигеров изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6060 LA в Центре общего пользования электронными микроскопами НАН Украины (Киев). Препараты готовили согласно методике (Chanley, Dinamani, 1980). Створки очищали от мягких тканей, погружая личинок на несколько секунд в 5 %-ный раствор гипохлорита натрия (NaOCl), затем промывали в дистиллированной воде с добавлением капли аммония для нейтрализации NaOCl.

Строение замка хорошо видно при осмотре створок с внутренней стороны. Если передние концы ориентировать направо, а задние — налево, тогда нижняя будет левая створка, а верхняя — правая. По системе индексации зубов замка, разработанной О. А. Скарлато и Я. И. Старобогатовым (1986), зубы правой створки нумеруются нечетными арабскими цифрами, а левой створки — четными, с тем чтобы при сомкнутых створках номера зубов образовывали последовательный ряд. К номерам передних зубов добавляется буква «а», а к номерам задних — «р». Кардинальные зубы отмечаются добавлением буквы «с», латеральные — «l».

Терминология для описания промеров раковин велигеров основана на работе П. Редферна (Redfern et al., 1986) (рис. 1); описание структуры замкового края личинок — на терминологии З. К. Захваткиной (1972).

## Результаты и обсуждение

При стимуляции нереста половозрелых особей анадары вымет половых продуктов происходил в морскую воду из двух гонодуктов, открывающихся на уровне третьего гребня заднего края раковины. Яйцеклетки розового цвета диаметром  $52,5 \pm 1,67$  мкм находились на стадии диакинеза профазы мейоза. На прижизненных препаратах яйцеклеток в световом микроскопе чётко просматривалось ядро, оптическая плотность которого меньше, чем цитоплазмы. Ядерная оболочка яйцеклеток, попавших в морскую воду, растворялась и хромосомы переходили в стадию метафазы I. В этой стадии они оставались до момента оплодотворения, т. е. блокировка процессов мейоза происходила на метафазе I. На метафазной пластинке анадары насчитывается 18 бивалентов размерами 2,3–11,2 мкм (рис. 2). В пробах, зафиксированных через 10 мин. после оплодотворения, обнаружены яйце-

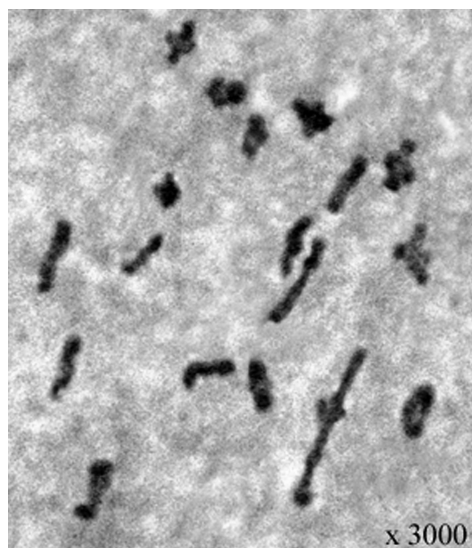


Рис. 2. Метафаза I в неоплодотворенной яйцеклетке анадары *A. inaequalvis*: видны 18 бивалентов (x3000).  
 Fig. 2. Metaphase I in the unfertilized ovum of *A. inaequalvis*: 18 bivalents can be seen (x3000).

клетки, хромосомы которых находились в стадии анафазы I. На 15-й мин. была отмечена максимальная их встречаемость (76,4 %), а на 20-й мин. — максимальная встречаемость на стадии анафазы II (67,1 %). Продолжительность I и II мейотических делений, определенная от момента оплодотворения до появления в пробах телофазы I и телофазы II, составила соответственно 15 и 25 мин., а определенная по максимальной встречаемости указанных стадий, 25 и 40 мин.

Процесс кариогамии произошёл на 45-й мин., а уже через 10 мин. наблюдали два blastomeres и формирование первой полярной лопасти. Синхронность первого митотического деления достигала 90 %. На 60-й мин. было отмечено второе митотическое деление (4 blastomeres), а через 15 мин. — третье (8 blastomeres). Развитие личиночной стадии — трохофоры — завершилось через 6 ч 15 мин. после оплодотворения, а на 10-м часу отмечена стадия стерробластулы, отличительной морфологической чертой которой является наличие длинных ресничек теменного султанчика (Малахов, Медведева, 1991) и характерные плавательные движения: прямо вперёд и вокруг оси по часовой стрелке. На этой стадии у личинок двустворчатых моллюсков происходит закладка органов, характерных для велигера, в том числе закладка раковинной железы (Малахов, Медведева, 1991). Через 19 ч после оплодотворения на спинной стороне личинок наблюдали растущую раковину в виде двулопастной пластинки, а по истечении 4 ч 30 мин. — все личинки перешли в стадию велигера.

В развитии раковины раннего велигера (продиссоконха) выделяют две стадии (Waller, 1981): продиссоконх I и продиссоконх II. Продиссоконх покрыт периостракумом, который в центральной зоне образует микровздутия и складки (рис. 3, а). У личинок двустворчатых моллюсков участок раковины вокруг замка — продиссоконх I — синтезирован раковинной железой стерробластулы и состоит из органического вещества — конхиолина с вкраплениями арагонита (Малахов, Медведева, 1991). На рисунке 3, б представлена микроструктура раковины велигера *A. inaequalvis*, где продиссоконх I и продиссоконх II разделены отчётливой волнистой линией, образованной плотно упакованными гранулами. Раковина продиссоконха I состоит из круглых гранул (до 0,25 мкм в диаметре); продиссоконха II — из гранул овальной или неправильно вытянутой формы диаметром более

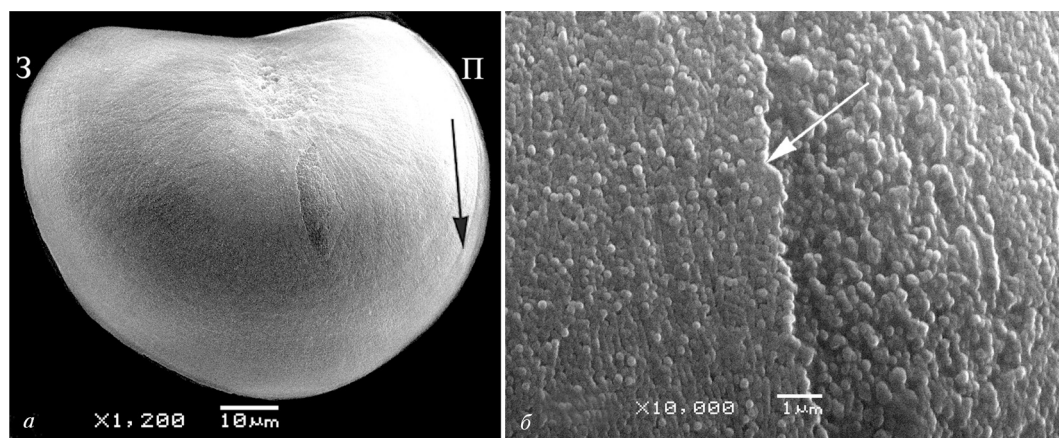


Рис. 3. *A. inaequalvis*: а — ранний велигер, возраст 2 суток: П — передний, 3 — задний край раковины (x1200); б — микроструктура раковины велигера; стрелкой показана линия, разделяющая продиссоконх I и продиссоконх II (x10000).

Fig. 3. *A. inaequalvis*: а — An early veliger, aged 2 days: П and 3 — the front and the back shell edges (x1200); б — veliger shell microstructure: the arrow shows the line differentiating prodissoconch I and prodissoconch II (x10000).

0,5 мкм. Продиссоконх II формируется эпителием мантийной складки велигера (Waller, 1981).

Длина раковины личинки на стадии велигера (возраст 2 сут) составила  $82,6 \pm 3,64$  мкм; высота раковины  $63,2 \pm 3,78$  мкм; отношение высоты к длине 0,77. В отличие от прямозамковых велигеров других видов двустворчатых моллюсков (Захваткина, 1972), линия замкового края раннего велигера анадары ломаная, с углом  $166^\circ$ , расположенным ближе к переднему краю (рис. 3, а). Длина замковой линии около 59 мкм, что составляет 71,4 % длины раковины. Передний край более округлый, поэтому край переднего плеча на 11,2 мкм больше заднего: соответственно 34,0 и 22,8 мкм. Длина переднего и заднего концов раковины соответственно 40,0 и 42,6 мкм; длина переднего и заднего плеча — 49,2 и 43,9 мкм. Высота плеча раковины 27,6 мкм, что на 55 мкм меньше длины личинки.

Важным систематическим признаком личинок двустворчатых моллюсков является строение первичного замка — провинкулюма (Захваткина, 1972). Замок правой и левой створок велигера *A. inaequalvis* состоит из 5 зубов (рис. 4). Схематически формулу замка провинкулюма велигера анадары можно записать в следующем виде:

$$\begin{array}{c} \underline{9pl\ 7pc\ 5ac\ 3ac\ 1al} \\ 10pl\ 8pc\ 6pc\ 4ac\ 2al \end{array}$$

На переднем крае правой створки — три зуба (1, 3, 5), разделенные двумя выемками (рис. 4). Форма 1-го и 5-го зубов трапециевидная с максимальной шириной 5,4 и 2,8 мкм, третьего — прямоугольная (ширина 4,6 мкм). В заднем крае провинкулюма расположены два прямоугольных зуба: 7-й и 9-й, причем седьмой шире, чем девятый в 2,5 раза (4,8 и 1,9 мкм соответственно). Между собой они разделены выемкой; выемкой также отделён 7-й зуб от срединной линии, а 9-й — от заднего края раковины. Длина срединной линии замка составляет 22,7 мкм, ширина — от 1,3 мкм (в центре) до 2,6 мкм (по краям). Строение провинкулюма левой створки комплиментарно таковому правой, т. е. каждому зубу (выступу) на правой створке соответствует выемка на левой створке аналогичная по размеру и форме.

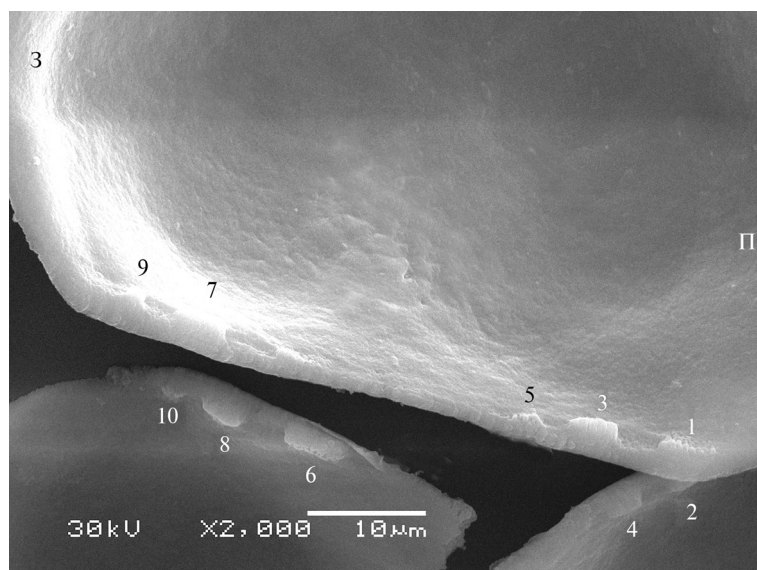


Рис. 4. Строение провинкулюма велигера *A. inaequalvis*: верхняя — правая, нижняя — левая створки: 1–10 номера зубов замкового края; П — передний, 3 — задний край раковины (x2000).

Fig. 4. The structure of a veliger *A. inaequalvis*'s provinculum: the upper — right, the low — left valves: 1–10 are the numbers of the lock edge teeth; П and 3 — the front and the back shell edge (x2000).

По всей площади смыкания замковых линий на правой и левой створках видна поперечная исчерченность (рис. 4). Зубы провинкулюма на боковых поверхностях также имеют характерные бороздки, напоминающие миниатюрные зубы взрослых моллюсков семейства Arcidae.

## Выводы

Двустворчатый моллюск *A. inaequalvis* с недавних пор — важный компонент экосистемы Чёрного моря и перспективный объект для марикультуры. Репродуктивные адаптации: наружное оплодотворение и наличие в развитии планктонной личиночной стадии — обеспечивают расширенное воспроизводство вида. Оплодотворение яйцеклеток размерами 52,5 мкм происходит на стадии метафазы первого мейотического деления. На метафазной пластинке — 18 бивалентов. Максимальная встречаемость анафазы I отмечена на 15-й мин. после оплодотворения. При температуре воды 25 °С процессы мейоза продолжались в течение 40 мин. Развитие личиночной стадии — трохофоры — завершилось через 6 ч 15 мин., стерробластулы — через 10 ч, велигера — через 23 ч 30 мин. Велигеры анадары отличаются от личинок других видов двустворчатых моллюсков характерными мофометрическими признаками: изогнутой линией замкового края, величиной отношения высоты к длине раковины равной 0,77 и строением провинкулюма, состоящего из 5 зубов на правой и левой створках. Данные о продолжительности стадий мейоза, эмбрионального и личиночного развития могут послужить для разработки биотехники её выращивания и генетического улучшения.

Благодарю Ольгу Андреевну Акимову, заведующую библиотекой Института биологии южных морей НАН Украины, за помощь в поиске литературных источников.

Анистратенко В. В., Халиман И. А. Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalvis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна // Вестн. зоологии. — 2006. — 40, № 6. — С. 505–511.

Захваткина К. А. Личинки двустворчатых моллюсков — Bivalvia // Определитель фауны Чёрного и Азовского морей. — Киев : Наук. думка, 1972. — Т. 3. — С. 250–271.

- Золотарёв В. Н., Золотарёв П. Н.* Двустворчатый моллюск *Cunearca cornea* — новый элемент фауны Чёрного моря // Докл. АН СССР. — 1987. — **297**, № 2. — С. 501–503.
- Казанкова И. И.* Сезонная динамика личинок двустворок и их вертикальное распределение в прибрежном планктоне внешнего рейда Севастопольской бухты (Чёрное море) // Экология моря. — 2002. — Вып. 61. — С. 59–63.
- Киселева М. И.* Сравнительная характеристика донных сообществ у побережья Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря / Отв. ред. В. Е. Заика. — Киев : Наук. думка, 1992. — С. 84–99.
- Малахов В. В., Медведева Л. А.* Эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков в норме и при воздействии тяжелых металлов. — М. : Наука, 1991. — 132 с.
- Найденко Т. Х., Вараксин А. А.* Стимуляция нереста у моллюсков и оценка жизнеспособности эмбрионов и личинок // Моллюски. Результаты и перспективы их исследования : Восьмое всесоюз. совещ. по изучению моллюсков (Ленинград, апр. 1987 г.). — Л., 1987. — С. 349–351.
- Пиркова Г. В., Ладигина Л. В.* / Пат. 76680 UA, МПК A01K 61/00. Спосіб вирощування гігантської устриці *Crassostrea gigas* у Чорному морі / Заявник Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України (UA). — № а 2005 07328, Заявл. 22.07.2005; Опубл. 15.08.2006 Бюл. № 82011 г.
- Пиркова А. В.* Гаметогенез и мейоз у устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища. — Житомир, 2006. — Вип. 2. — С. 227–230.
- Ревков Н. К., Болтачѐва Н. А., Николаенко Т. В., Колесникова Е. А.* Биоразнообразие зообентоса рыхлых грунтов Крымского побережья Чёрного моря // Океанология. — 2002. — **42**, № 4. — С. 561–571.
- Скарлато О. А., Старобогатов Я. И.* Опыт новой системы индексации зубов замка двустворчатых моллюсков // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. — 1986. — **148**. — С. 33–38.
- Чикина М. В., Колочкина Г. А., Кучерук Н. В.* Аспекты биологии размножения *Scapharca inaequalis* (Bruguière) (Bivalvia, Arcidae) в Чёрном море // Экология моря. — 2003. — Вып. 64. — С. 72–77.
- Chanley P., Dinamani P.* Comparative descriptions of some oyster larvae from New Zealand and Chile, and a description of a new genus of oyster, *Tiostrea* // New Zealand J. Marine & Freshwater Research. — 1980. — **14**, N 2. — P. 103–120.
- Furuta H., One M., Kajita A.* Structure of Hemoglobins from Erythrocytes of the Blood Clam, *Anadara* // J. Biochem. — 1977. — **82**, N 6. — P. 1723–1730.
- Redfearn P., Chanley P., Chanley M.* Larval shell development of four species of New Zealand mussels: (Bivalvia, Mytilacea) // New Zealand J. Marine & Freshwater Research. — 1986. — **20**. — P. 157–172.
- Sahin C. A.* Study on the Population Structure and Gonadal Development of *Anadara cornea* (Reev., 1844) in the Eastern Black Sea. (Ph. D. Thesis, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Karadeniz Technical University — 1999). — Trabzon (Turkish), 1999. — P. 102.
- Waller T. R.* Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linne // Smithsonian Contrib. Zool. — 1981. — N 328. — P. 1–70.
- Zenetos A., Gofas S., Russo G., Templado J.* Ciesm Atlas of exotic species in the Mediterranean. — Monaco : CIESM, 2003. — 376 p.