



УДК 594.121:591.3(262.5)

**МЕЙОЗ, ЭМБРИОНАЛЬНОЕ И ЛИЧИНОЧНОЕ РАЗВИТИЕ
ЧЕРНОМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *FLEXOPECTEN GLABER PONTICUS*
(BUCQUOY, DAUTZENBERG & DOLLFUS, 1889) (BIVALVIA, PECTINIDAE)**

© 2017 г. **А. В. Пиркова**, канд. биол. наук, с. н. с., **Л. В. Ладыгина**, канд. биол. наук, с. н. с.

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия
E-mail: maricultura@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2017 г. Принята к публикации 18.12.2017 г.

Изучены хронология стадий мейоза после оплодотворения, а также эмбриональное и личиночное развитие двустворчатого моллюска гребешка *Flexopecten glaber ponticus* — эндемика Чёрного моря, сокращающегося в численности и занесённого в Красную книгу Крыма. Размножается в июне — июле. Синхронный гермафродит, способный к самооплодотворению. При стимуляции нереста вымет зрелых яйцеклеток диаметром $54,7 \pm 2,11$ мкм и оплодотворение происходят на стадии метафазы I мейоза. На метафазной пластинке — 12 бивалентов, размерами от 1,59 до 4,54 мкм. Установлена продолжительность стадий мейоза, эмбрионального развития и развития личинок. Описано строение провинкулума велигера гребешка. Замок правой и левой створок состоит из 4 зубов (по два спереди и сзади на каждой створке). Представлены промеры личинок. Описание морфологии раковины и замка облегчит идентификацию личинок гребешка на стадии велигера, выловленных из планктона. Данные о продолжительности стадий мейоза и эмбрионального и личиночного развития могут быть использованы при разработке биотехники культивирования этого двустворчатого моллюска.

Ключевые слова: Bivalvia, Pectinidae, *Flexopecten glaber ponticus*, мейоз, биваленты, эмбриональное развитие, велигер, провинкулум, Чёрное море

Двустворчатый моллюск *Flexopecten glaber ponticus* — эндемик Чёрного моря, подвид, сокращающийся в численности [4]. Обитает на глубине до 30 м на поверхности илистых, песчаных, ракушечных грунтов и на устричниках [5]. Обладает способностью к временной фиксации на располагающихся над грунтом талломах растительности. Окраска раковин варьирует от белой или жёлтой до красной и коричневой, часто правая створка светлее левой. Длина и высота раковины — до 55 мм, ширина — до 13 мм [5].

Черноморский гребешок — синхронный гермафродит. При синхронном гермафродитизме каждая особь одновременно продуцирует и женские, и мужские гаметы. Такие виды обладают способностью к самооплодотворению [9]. В литературе описаны ультраструктурные характеристики сперматозоидов средиземноморского гребешка *F. glaber*, являющиеся типичными видовыми признаками [11]. Форма головки сперматозоида грушевидная, размерами 2,5 мкм, с 4 митохондриями диаметром 0,6 мкм; длина жгутика — до 45 мкм. Ядро занимает большую часть головки сперматозоида и содержит плотные волокна хроматина. У гребешка *F. glaber*, обитающего в Северной Адриатике, изучен сперматогенез и описана динамика гонадо-соматического индекса в течение года [12]. Показано, что этот показатель увеличивался с января по июнь и уменьшался с июля по сентябрь, что соответствовало периодам гаметогенеза и нереста.

Черноморский гребешок *F. glaber ponticus* размножается в июне — июле [8]. В планктоне личинки на стадии великонхи встречаются в течение июня — августа [2]. Описаны форма великонхи гребешка

и строение провинукума [2]. Замок состоит из прямоугольных зубчиков, не одинаковых по величине (по три с каждой стороны лигамента). По мере роста раковины количество зубов увеличивается [2]. Однако до настоящего времени личинка гребешка на стадии велигера не описана. В литературе также отсутствует описание мейоза и раннего эмбрионального развития *F. glaber ponticus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2015–2016 гг. Спат гребешка, осевший в садки с гигантскими устрицами, подвешенными на мидийно-устричной ферме (внешний рейд Севастопольской бухты) на глубине 3–5 м, собирали и доращивали до половозрелости (возраст 2 года). В качестве производителей отобрали 10 половозрелых особей с длиной раковины около 40 мм. После механической очистки раковин от обрастания их промывали в морской воде; без этапа кондиционирования 24 июля 2016 г. стимулировали нерест. Для стимуляции использовали 0,003 % раствор серотонина ($C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot H_2SO_4$) на морской воде при температуре воды 24 °С. В межстворчатую полость моллюска, находящегося вне воды, вводили по 1 мл раствора [7]. Затем гребешков помещали по одному в ёмкости с морской водой объёмом 500 мл. Нерест начинался через 15–30 мин. Чтобы предотвратить полиспермию, оплодотворённые яйцеклетки промывали профильтрованной морской водой, используя газ-сито с размером ячеек 32 мкм, а производителей несколько раз переносили в чистую воду. Личинок получили в результате двух индивидуальных скрещиваний и самооплодотворения. Эмбриональное и раннее личиночное развитие гребешка проходило в профильтрованной морской воде с постоянной аэрацией, ежедневной сменой воды, подачей корма при температуре 24 °С; плотность посадки — 20 тыс. оплодотворённых яйцеклеток и эмбрионов на литр и 10 тыс. велигеров на литр. Корм личинок состоял из смеси 3 видов микроводорослей (*Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*) концентрацией 100 тыс. кл·мл⁻¹ [7].

Мейоз изучали на временных давленных препаратах неоплодотворённых и оплодотворённых яйцеклеток. Материал фиксировали в этанол-уксусном растворе (3:1). Препараты окрашивали 2 % ацетоорсеином в течение трёх часов при температуре 25 °С. Из каждой фиксации просматривали по 25–30 объектов с помощью микроскопа Axioskop 40 C. Zeiss при увеличении $\times 400$ и $\times 1000$, фотокамеры Canon PowerShot A640 и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.6. Фотографии метафаз обработаны в Adobe Photoshop (версия 4) с использованием контраста, оптимизации цвета и фильтра. Относительную длину бивалентов определяли согласно [1].

Длину бивалентов, промеры яйцеклеток и личинок, а также детали строения замкового края велигеров изучали с помощью микроскопа Bresser Science TRM-301 и программного обеспечения Altami Studio 3.4. Личинок предварительно обездвигивали в парах формальдегида или фиксировали в растворе 4 % формалина на морской воде. Для изучения строения замка створки личинок очищали от мягких тканей, погружая их на несколько секунд в 5 % раствор гипохлорита натрия (NaOCl), затем промывали в дистиллированной воде с добавлением капли аммония для нейтрализации NaOCl. Для описания промеров раковин велигеров использована терминология из [13] (рис. 1); описание структуры замкового края личинок приведено по З. К. Захваткиной [2]. Средние значения и доверительные интервалы вычислены в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлен половозрелый черноморский гребешок *F. glaber ponticus*. Гонада на нерестовой стадии двухцветная: мужская часть кремового цвета (рис. 2: 1), женская — оранжевого (рис. 2: 2), причём обе части тесно соприкасаются.

Нерест порционный, чередующийся. При стимуляции нереста половозрелых особей сначала происходил вымет сперматозоидов, а затем — яйцеклеток из одних и тех же половых протоков, однако многократное перенесение производителей в чистую воду дало возможность собрать неоплодотворённые яйцеклетки. Зрелые яйцеклетки диаметром $54,68 \pm 2,11$ мкм находились на стадии метафазы I мейоза. На этой стадии они оставались до момента оплодотворения, т. е. блокировка процессов мейоза у гре-

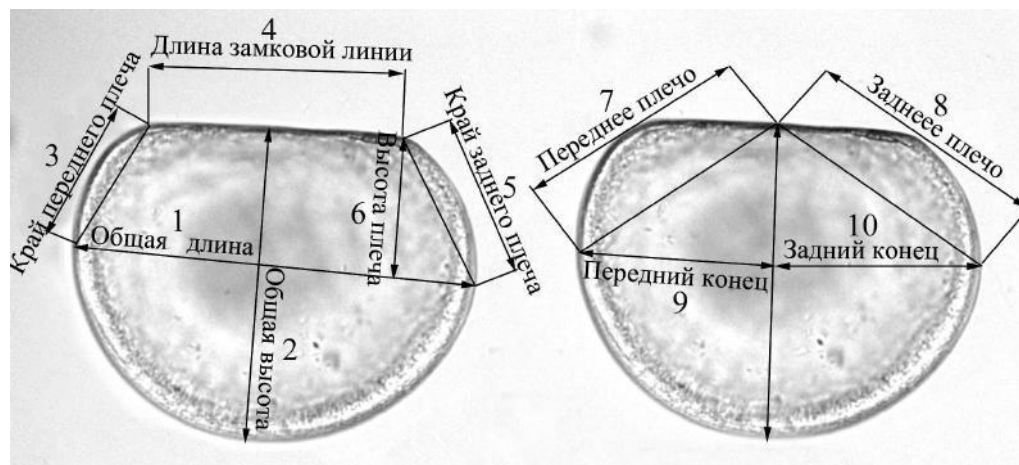


Рис. 1. Измерение продольных профилей у велигеров двустворчатых моллюсков (по [13])

Fig. 1. Measuring grade profile in veliger bivalve larva: 1 – overall length; 2 – overall height; 3 – front shoulder edge; 4 – length of the lock line; 5 – edge of back shoulder; 6 – shoulder height; 7 – front shoulder; 8 – back shoulder; 9 – front end; 10 – back end (after [13])



Рис. 2. Половозрелая особь черноморского гребешка *Flexopecten glaber ponticus*: 1 — мужская часть гонады, 2 — женская часть гонады

Fig. 2. Mature adult of the Black Sea small scallop *Flexopecten glaber ponticus*: 1 – male part of gonade, 2 – female part of gonade

бешка происходит на метафазе I. На метафазной пластинке гребешка насчитывается 12 бивалентов размерами от 1,59 до 4,54 мкм (рис. 3, табл. 1). Общая длина бивалентов составляет 36,43 мкм. Их относительная длина изменяется в пределах от 4,36 до 12,46 %.

В пробах, зафиксированных через 7 мин после оплодотворения, обнаружены яйцеклетки, хромосомы которых находились в стадии анафазы I. На 13-й минуте была отмечена их максимальная встречаемость (72,3 %), а на 18-й минуте — максимальная встречаемость на стадии анафазы II (65,2 %). Продолжительность I и II мейотических делений, определённая от момента оплодотворения до появления в пробах телофазы I и телофазы II, составила 13 и 23 мин. Продолжительность, определённая по максимальной встречаемости указанных стадий, — 23 и 38 мин соответственно.

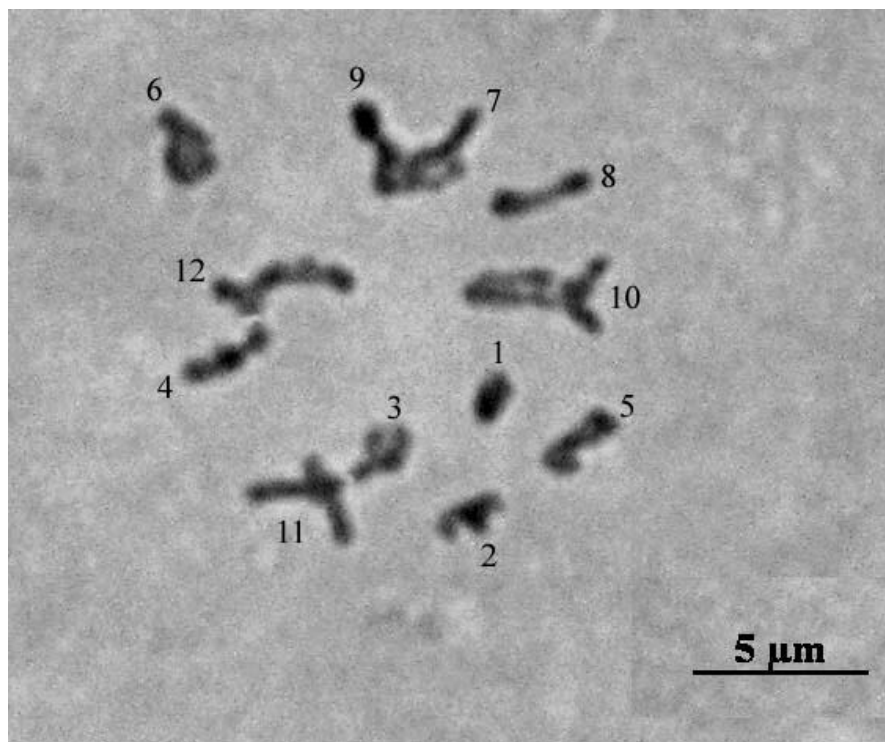


Рис. 3. Метафаза I в неоплодотворённой яйцеклетке гребешка *Flexopecten glaber ponticus*: видны 12 бивалентов

Fig. 3. Metaphase I in the unfertilized ovum of *Flexopecten glaber ponticus*: 12 bivalents can be seen

Таблица 1. Размеры и относительная длина бивалентов в метафазе I неоплодотворённых яйцеклеток черноморского гребешка *Flexopecten glaber ponticus*

Table 1. Measurements and relevant length of bivalents at the first metaphase of no fertilized egg of the Black Sea scallop *Flexopecten glaber ponticus*

№ бивалентов	Размеры бивалентов, мкм	Относительная длина бивалентов, %
1	1,59	4,36
2	1,84	5,05
3	2,24	6,15
4	2,51	6,89
5	2,76	7,58
6	2,79	7,66
7	3,01	8,26
8	3,01	8,26
9	3,30	9,06
10	4,34	11,91
11	4,50	12,35
12	4,54	12,46
Σ длина	36,43	100,00

Процесс кариогамии произошёл на 43-й минуте, а уже через 8 мин наблюдали два blastomeres и формирование первой полярной лопасти. Синхронность первого митотического деления достигала 70 %. На 60-й минуте было отмечено второе митотическое деление (4 blastomeres), а через 15 мин — третье (8 blastomeres).

Оплодотворённое яйцо делится неравномерно. Дробление спиральное, гетероквадратное. В процессе дробления через 7 ч после оплодотворения формируется стереобластула. Отличительными мор-

фологическими чертами этой стадии являются, как и у других двустворчатых моллюсков, наличие длинных ресничек теменного султанчика и характерные плавательные движения — прямо вперёд и вокруг оси по часовой стрелке [3, 14]. Развитие личиночной стадии трохофоры завершается на 10-м часу после оплодотворения. На этой стадии у личинок двустворчатых моллюсков происходит закладка органов, характерных для велигера, в т. ч. закладка раковинной железы. Через 20 ч наблюдается растущая раковина в виде двулопастной пластинки. Через сутки все личинки переходят в стадию D-велигера (продиссоконх I); длина раковины составляет 70 мкм (рис. 4). Провинкулум D-велигера не имеет зубов. К концу первой недели в развитии личинок гребешка (продиссоконх II) наблюдаются морфологические изменения, достаточные для видовой идентификации.

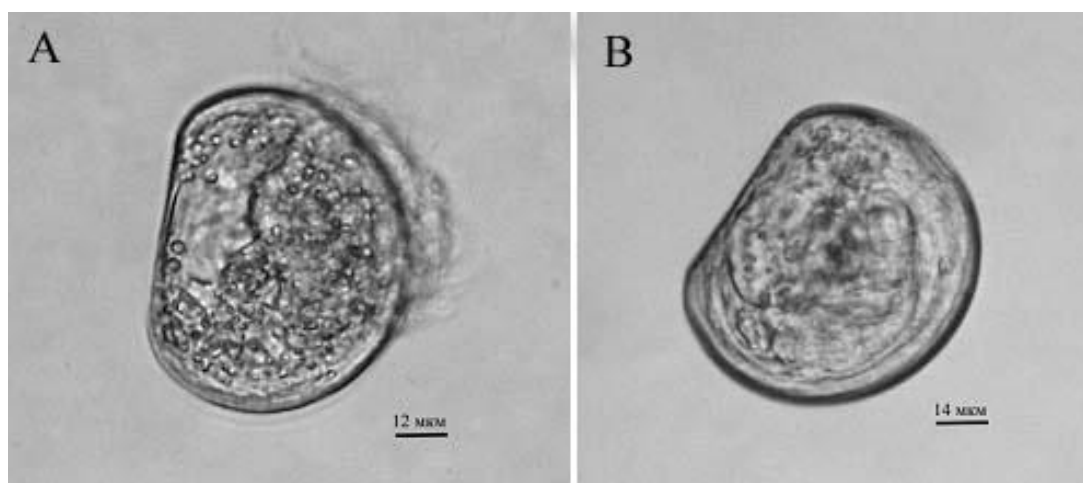


Рис. 4. Личинки гребешка *Flexopecten glaber ponticus* на стадии велигера: А — возраст 1 сутки; В — возраст 8 суток

Fig. 4. Larvae of small scallop *Flexopecten glaber ponticus* at veliger stage: A – 1 day; B – 8 days

Общая длина раковины личинки на стадии велигера (возраст 8 сут) составляет $88,12 \pm 1,36$ мкм; общая высота раковины — $69,89 \pm 0,91$ мкм; отношение высоты к длине раковины — 0,79. У морфологически схожих велигеров мидии *Mytilus galloprovincialis* этот показатель равен 0,7, а у митилястера *Mytilaster lineatus* — 0,9 [2]. Линия замкового края велигеров гребешка прямая, как у других видов двустворчатых моллюсков. Длина замкового края — $57,22 \pm 0,24$ мкм, что составляет 64,9 % длины раковины. Отношение длины замкового края к длине раковины у велигера гребешка составляет 0,65, у мидии — 0,8, а у митилястера — 0,9. Задний край велигера более округлый, поэтому край заднего плеча на 1,66 мкм больше края переднего ($34,86 \pm 1,28$ и $33,20 \pm 0,84$ мкм соответственно). Длина переднего и заднего концов раковины — $42,21 \pm 0,65$ и $43,49 \pm 1,16$ мкм; длина переднего и заднего плеча — $51,79 \pm 0,80$ и $53,11 \pm 1,18$ мкм. Высота плеча раковины — $29,96 \pm 0,90$ мкм, что на 39,93 мкм меньше высоты раковины личинки.

В течение 8 суток темп роста личинок гребешка на стадии велигера составлял около 3 мкм·сут⁻¹, что значительно ниже среднесуточного показателя роста велигеров мидии *M. galloprovincialis* и черноморской устрицы *Ostrea edulis*, выращиваемых в питомнике [7].

Важным систематическим признаком личинок двустворчатых моллюсков является строение первичного замка, т. е. провинкулума [2]. Число, форма и расположение зубов в замке постоянны для каждой стадии развития, и по этим признакам можно чётко определить видовую принадлежность личинок [10].

Строение замка хорошо видно при осмотре створок с внутренней стороны (рис. 5). Если передние концы раковин ориентировать вверх, а задние — вниз, тогда слева будет левая створка, а справа — правая. Замок как правой, так и левой створок велигера гребешка состоит из 4 зубов (по два спереди и

сзади на каждой створке раковины). По системе индексации зубов замка, разработанной О. А. Скарлато и Я. И. Старобогатовым [6], нумерацию зубов начинают с переднего края правой створки нечётными арабскими цифрами, с тем чтобы при сомкнутых створках номера зубов образовывали последовательный ряд. К номерам передних зубов добавляют букву *a*, а к номерам задних — *p*. Кардинальные зубы отмечают добавлением буквы *s*, латеральные — *l*. Схематически формулу провинкулума велигера гребешка можно записать в следующем виде:

$$\begin{array}{cccc} 8pl & 6pc & 3ac & 1al \\ \hline 7pl & 5pc & 4ac & 2al \end{array}$$

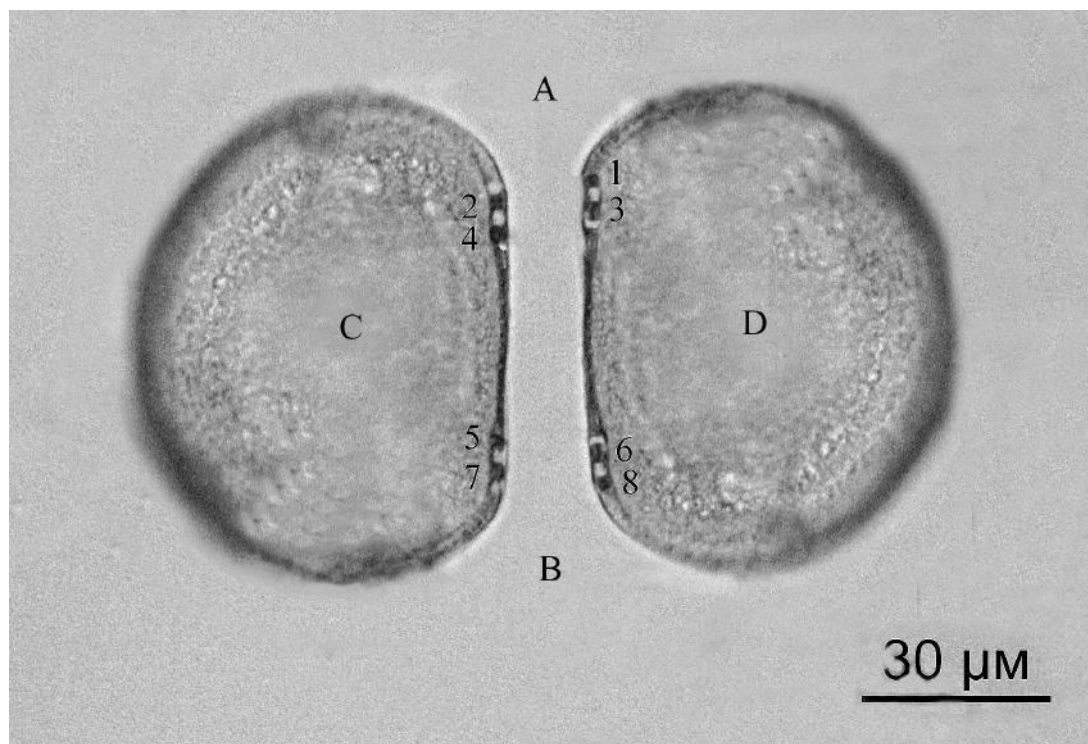


Рис. 5. Строение провинкулума велигера гребешка *Flexopecten glaber ponticus*: 1–8 — номера зубов замкового края; А — передний край раковины, В — задний край раковины, С — левая створка, D — правая створка

Fig. 5. The structure of the provinculum of the veliger scallop *Flexopecten glaber ponticus*: 1–8 are the numbers of the lock edge teeth; A – front shell edge, B – back shell edge, C – left valve, D – right valve

На переднем крае правой створки — 2 зуба (1, 3), разделённые выемками между собой и от срединной линии (рис. 5). Форма зубов 1 и 3 прямоугольная, ширина — 2,06 и 2,54 мкм. В заднем крае провинкулума расположены два трапециевидных зуба (6 и 8) с максимальной шириной 2,84 и 2,51 мкм соответственно. Между собой они разделены выемкой; выемкой также отделён зуб 6 от срединной линии. Ширина срединной линии замка составляет от 1,37 (в центре) до 2,70 мкм (по краям).

Строение провинкулума правой створки комплиментарно таковому левой, т. е. каждому зубу (выступу) на правой створке соответствует выемка на левой створке, аналогичная по размеру и форме. По всей площади смыкания замковых линий на правой и левой створках слабо просматривается поперечная исчерченность (рис. 5).

Заключение. В личиночном развитии черноморских гребешков прослеживается ряд стадий: стереобластула, трохофора, велигер, великонха и педивелигер. Личинки большинства видов двустворча-

тых моллюсков на стадии велигера очень похожи, и поэтому одних морфологических наблюдений недостаточно для их идентификации. Важными видовыми признаками являются строение замкового края и морфометрические характеристики раковины. Полученные результаты по морфометрии раковины и замка облегчат идентификацию личинок гребешка на стадии велигера, выловленных из планктона. Данные о продолжительности стадий мейоза, эмбрионального и личиночного развития могут быть использованы при разработке биотехники воспроизводства *F. glaber ponticus*, что является важным для данного вида, сокращающегося в численности.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по теме «Разработка научных основ решения гидробиологических и биотехнологических проблем интегрированного управления прибрежными зонами» (гос. рег. № 115081110011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бершене Я. В. Изучение хромосомных комплексов // *Методы изучения двустворчатых моллюсков* / под ред. Г. Л. Шкорбатова, Я. И. Старобогатова. Ленинград : Зоологический институт, 1990. С. 37–45. [Bershene Ya. V. Izuchenie khromosomnykh kompleksov. In: *Metody izucheniya dvustvorchatykh mollyuskov*. G. L. Shkorbatova, Ya. I. Starobogatova (Eds.). Leningrad: Zoologicheskii institut, 1990, pp. 37–45. (in Russ.)].
2. Захваткина К. А. Личинки двустворчатых моллюсков – Bivalvia // *Определитель фауны Чёрного и Азовского морей*. Киев : Наукова думка, 1972. Т. 3. С. 250–271. [Zakhvatkina K. A. Lichinki dvustvorchatykh mollyuskov – Bivalvia. In: *Opredelitel' fauny Chernogo i Azovskogo morei*. Kiev: Naukova dumka, 1972, vol. 3, pp. 250–271. (in Russ.)].
3. Малахов В. В., Медведева Л. А. Эмбриональное развитие двустворчатых моллюсков в норме и при воздействии тяжёлых металлов. Москва : Наука, 1991. 132 с. [Malakhov V. V., Medvedeva L. A. *Embrional'noe razvitie dvustvorchatykh mollyuskov v norme i pri vozdeistvii tyazhelykh metallov*. Moscow: Nauka, 1991, 132 p. (in Russ.)].
4. Ревков Н. К. Гребешок черноморский *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889) // *Красная книга Республики Крым. Животные* / отв. ред.: С. П. Иванов, А. В. Фатерыга. Симферополь : ООО «ИТ АРИАЛ», 2015. С. 39. [Revkov N. K. Grebeshok chernomorskii *Flexopecten glaber ponticus* (Bucquoy, Dautzenberg et Dollfus, 1889). In: *Krasnaja kniga Respubliki Krym. Zhivotnye*. S. P. Ivanov, A. V. Fateryga (Eds.). Simferopol: ООО «ИТ АРИАЛ», 2015, pp. 39. (in Russ.)].
5. Скарлато О. А., Старобогатов Я. И. Класс двустворчатые моллюски – Bivalvia // *Определитель фауны Чёрного и Азовского морей*. Киев : Наукова думка, 1972. Т. 3. С. 178–250. [Skarlato O. A., Starobogatov Ya. I. Klass dvustvorchatye mollyuski – Bivalvia. In: *Opredelitel' fauny Chernogo i Azovskogo morei*. Kiev: Naukova dumka, 1972, vol. 3, pp. 178–250. (in Russ.)].
6. Скарлато О. А., Старобогатов Я. И. Опыт новой системы индексации зубов замка двустворчатых моллюсков // *Труды Зоологического института АН СССР*. 1986. Т. 148. С. 33–38. [Skarlato O. A., Starobogatov Ya. I. Opyt novoi sistemy indeksatsii zubov zamka dvustvorchatykh mollyuskov. *Trudy Zoologicheskogo instituta AN SSSR*, 1986, vol. 148, pp. 33–38. (in Russ.)].
7. Холодов В. И., Пиркова А. В., Ладыгина Л. В. Выращивание мидий и устриц в Чёрном море : практическое руководство / под ред.: В. Н. Еремеева. Севастополь : DigitPrint, 2010. 422 с. [Kholodov V. I., Pirkova A. V., Ladygina L. V. *Vyrashchivanie midii i usrits v Chernom more*: prakticheskoe rukovodstvo. V. N. Eremeev (Ed.). Sevastopol: DigitPrint, 2010, 422 p. (in Russ.)].
8. Berik N., Cankiriligi E., Gul G. Mineral content of smooth scallop (*Flexopecten glaber*) caught Canakkale, Turkey and evaluation in terms of food safety. *Journal of Trace Elements in*

- Medicine and Biology*, 2017, vol. 42, pp. 97–102. doi: [10.1016/j.jtemb.2017.04.011](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.04.011).
9. Jarne P., Auld J.R. Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution*, 2006, vol. 60, iss. 9, pp. 1816–1864. doi: [10.1554/06-246.1](https://doi.org/10.1554/06-246.1).
10. Le Pennec M. The larval and post-larval hinge of some families of bivalve mollusks. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1980, vol. 60, iss. 3, pp. 601–617. doi: [10.1017/S0025315400040297](https://doi.org/10.1017/S0025315400040297).
11. Le Pennec G., Aloui-Bejaoui N., Le Pennec M. Spermatozoa and phylogeny of the pectinid bivalve *Flexopecten glaber*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2006, vol. 86, iss. 2, pp. 425–428. doi: [10.1017/S0025315406013300](https://doi.org/10.1017/S0025315406013300).
12. Marceta T., Da Ros L., Marin M. G. Overview of the biology of *Flexopecten glaber* in the North Western Adriatic Sea (Italy): A good candidate for future shellfish farming aims? *Aquaculture*, 2016, vol. 462, pp. 80–91. doi: [10.1016/j.aquaculture.2016.04.036](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.036).
13. Redfearn P., Chanley P., Chanley M. Larval shell development of four species of New Zealand mussels: (Bivalvia, Mytilacea). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1986, vol. 20, iss. 2, pp. 157–172. doi: [10.1080/00288330.1986.9516140](https://doi.org/10.1080/00288330.1986.9516140).
14. Waller T.R. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linne. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 1981, vol. 328, pp. 1–70. doi: [10.5479/si.00810282.328](https://doi.org/10.5479/si.00810282.328).

**MEIOSIS, EMBRYONIC, AND LARVAL DEVELOPMENT
OF THE BLACK SEA SCALLOP *FLEXOPECTEN GLABER PONTICUS*
(BUCQUOY, DAUTZENBERG & DOLLFUS, 1889) (BIVALVIA, PECTINIDAE)**

A. V. Pirkova, L. V. Ladygina

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: maricultura@mail.ru

The bivalve *Flexopecten glaber ponticus* is an endemic and extinguishing species of the Black Sea listed in Red book of Crimea. The sequence of meiosis stages following fertilization; embryonic and larval development of *F. glaber ponticus* were studied. The bivalve reproduces in June and July; these mollusks are simultaneous hermaphrodites. When spawning stimulated, fertilization of mature ova 54.7 ± 2.11 mkm in diameter take place at the first metaphase stage of meiosis. There were 12 bivalents with the sizes from 1.59 to 4.54 mkm on the metaphase plate. The duration of meiosis stage, embryonic and larvae development were determined. The structure of veliger provinculum was described. Right and left lock-valves consist of 4 teeth: two of them are on the front and back side on each valve. Measurements of larvae are presented. The description of shell and lock morphology will enable identification of *F. glaber ponticus* larvae at planktonic veliger stage. The data on duration of meiosis stage, embryonic and larvae development can be used in developing biotechnics of bivalve reproduction.

Keywords: Bivalvia, Pectinidae, *Flexopecten glaber ponticus*, meiosis, bivalents, embryonic development, veliger, provinculum, Black Sea