

Морфометрические особенности личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) в онтогенезе

А.В. ПИРКОВА¹, Л.В. ЛАДЫГИНА²

ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, пр. Нахимова, 2,
Севастополь, 299011, РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ
E-mail: ¹avpirkova@mail.ru; ²lvladygina@yandex.ru

РЕЗЮМЕ. Морфометрические особенности личинок мидии *Mytilus galloprovincialis*, выявленные в онтогенезе, могут быть основой для их идентификации в пуле личинок других видов двустворчатых моллюсков из планктона Чёрного моря. В работе представлены фотографии живых личинок мидий и СЭМ-изображения замкового края личинок на разных стадиях развития: D-велигера, велигера, великонхи и педивелигера. Показана последовательность изменения морфологии провинкулюмов, размеров и формы раковины, начиная от ранней прямозамковой стадии велигера до метаморфоза. Определены зависимости высоты (H , мкм) от длины (L , мкм) [$H = 1,0022 \cdot L - 29,374$; $R^2 = 0,9879$] и длины замкового края (l , мкм) от длины (L , мкм) раковин [$l = 0,0009 \cdot L^2 - 0,018 \cdot L + 77,78$; $R^2 = 0,9872$] личинок мидий размерами от 98 до 350 мкм. Элементный состав замкового края раковин личинок на стадиях велигера, великонхи и педивелигера, определенный с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии EDS(x), показал наличие кальция, углерода, кислорода, натрия и хлора. Магний определен только в замковом крае педивелигеров.

[https://doi.org/10.35885/ruthenica.2024.34\(3\).4](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2024.34(3).4)

Morphometric features of larvae of the mussel
Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819)
(Bivalvia: Mytilidae) in ontogenesis

A. V. Pirkova¹, L. V. Ladygina²

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of
Russian Academy of Sciences. 2 Nakhimov av., Sevastopol,
299011, RUSSIAN FEDERATION

E-mail: ¹avpirkova@mail.ru ²[e-mail: lvladygina@yandex.ru](mailto:lvladygina@yandex.ru)

ABSTRACT. Sequentially appearing in ontogenesis, the morphometric features of mussel *Mytilus galloprovincialis* larvae can serve as a basis for their species identification among the pool of larvae of other bivalve mollusc species found in the Black Sea plankton. The study presents the photographs of live mussel larvae and scanning electron microscope (SEM) images of the larvae hinge at different developmental stages: D-veliger, veliger, veliconcha and pediveliger. There was shown the sequence of morphological changes in provinculum, as well as the shell's size and shape changes, from the earliest straight-hinge stage of veliger up to metamorphosis. The correlation between shell height (H , μm) and shell length (L , μm) [$H = 1.0022 \cdot L - 29.374$; $R^2 = 0.9879$], as well as the correlation between hinge edge length (l , μm) and shell length (L , μm) [$l = 0.0009 \cdot L^2 - 0.018 \cdot L + 77.78$; $R^2 = 0.9872$] were determined for mussel larvae ranging in size from 98 to 350 μm . By employing energy dispersive X-ray spectroscopy EDS(x),

the elemental composition of the larvae shell's hinge edge at the stages of veliger, veliconcha and pediveliger was determined; and it showed the presence of calcium, carbon, oxygen, sodium and chlorine. Magnesium was detected in pediveligers' hinge edge only.

Введение

При исследовании меропланктона Чёрного моря доля личинок двустворчатых моллюсков намного выше, чем численность личинок других беспозвоночных. Обширные данные, иллюстрирующие это преобладание, приведены в ранее опубликованных работах [Zakhvatkina, 1972; Kiseleva, 1981; Lisitskaya, 2001, 2017]. Несмотря на обычную встречаемость личинок двустворчатых моллюсков в прибрежных водах, таксономическая принадлежность многих из них остается неопределенной. Указывается на сложность идентификации личинок двустворчатых моллюсков на ранних стадиях развития по причине отсутствия знаний о форме и размерах личинок двустворчатых моллюсков, начиная со стадии D-велигера до стадии педивелигера [Lisitskaya, 2017]. В качестве параметров идентификации личинок двустворчатых моллюсков учитываются размеры и форма раковины, включая детали замкового

края [Loosanoff *et al.*, 1966; Zakhvatkina, 1972; Le Pennec, Masson, 1976]. Однако отрывочные данные о морфометрических характеристиках личинок двустворчатых моллюсков из планктона создают трудности в определении их видовой принадлежности.

В Чёрном море наблюдаются два пика численности личинок мидий: в конце апреля-мае и в сентябре-октябре. В самые тёплые и холодные месяцы года встречаются единичные экземпляры [Zakhvatkina, 1972]. В акватории мидийно-устричной фермы (внешний рейд Севастопольской бухты) весенний пик численности личинок (до 176 экз.·м⁻³) зарегистрирован в апреле при температуре воды 11,2°C, а осенний – в октябре при температуре воды около 17°C [Lisitskaya, 2017]. Известно, что из биоценоза мидий в пелагиаль поступает наибольшее количество личинок, т.к. руководящий вид – *M. galloprovincialis* – имеет очень высокую плодовитость и характеризуется растянутыми во времени периодами размножения [Kiseleva, 1981]. Мидийные фермы на Чёрном море также являются важным источником личинок. Годовое производство мидий в России в последнее десятилетие составило около 200 т [Kholodov *et al.*, 2017]. До товарного размера на коллекторах фермы мидий дорастивают в течение 1,5–2,0 года. За этот срок они могут отнереститься 3–4 раза, т.к. половозрелыми мидии становятся в первый год жизни [Pirkova *et al.*, 2019].

Оплодотворение яйцеклеток происходит в воде. Последующее развитие можно условно разделить на 3 отдельные фазы: лецитотрофная, роста и оседания [Zakhvatkina, 1972]. Лецитотрофная фаза продолжается около 3-х сут. и включает эмбриональное развитие, стадии стерробластулы и трохофоры. Эта фаза заканчивается секрецией D-образной раковины. Продолжительность фазы роста составляет нескольких недель. Личинки питаются, увеличиваются в размерах, проходят стадии велигера и великонхи. При длине раковины около 300 мкм появляется нога, с помощью которой личинка выбирает субстрат для оседания. Метаморфоз личинок начинается при длине раковины 320 мкм [Le Pennec, Masson, 1976]. Личинки на стадии педивелигера могут, однако, оставаться в планктоне до размеров 360 мкм (собственные наблюдения).

Идентификация личинок двустворчатых моллюсков имеет практическое значение, что связано с биотехникой выращивания мидий.

Цель работы: исследовать динамику морфометрических и анатомических характеристик, строение и элементный состав замкового края раковин личинок мидии *M. galloprovincialis* в онтогенезе при выращивании в лабораторных условиях для выявления критериев видовой идентификации.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили личинки мидий, полученные и выращенные в лабораторных условиях. Половозрелые мидии *M. galloprovincialis*, выращенные на морской ферме (внешний рейд Севастопольской бухты), в количестве 25 экз. размерами от 33 до 60 мм, были отобраны при температуре воды 11°C. После механической очистки, мидии были перенесены в морскую воду с аэрацией (температура 14°C; объём 10 л). По истечении нескольких часов у двух самок и двух самцов начался нерест, вызванный повышением температуры [Kholodov *et al.*, 2017]. Их рассадил по одному экземпляру в ёмкости с профильтрованной морской водой объёмом 500 мл. После нереста половые продукты очистили от примесей, пропустив суспензию с яйцеклетками через сито с размером ячеек 112 мкм, а сперму – через сито с размером ячеек 56 мкм. После оплодотворения плотность посадки эмбрионов составила 30 тыс. экз.·л⁻¹; на стадии велигера – 15 тыс. лич.·л⁻¹; на стадии великонхи – 10 тыс. лич.·л⁻¹; на стадии педивелигера – 5 тыс. лич.·л⁻¹ согласно методике [Kholodov *et al.*, 2017]. Плотность посадки личинок подсчитывали в камере Богорова под микроскопом, отобрав 3 раза штемпель-пипеткой по 1 мл предварительно сконцентрированных личинок в объёме 500 мл.

Личинок выращивали в 3-х литровых ёмкостях в профильтрованной морской воде с аэрацией, при температуре воды от 14 до 16°C, солёности – 18‰ и естественном освещении. Первый раз воду меняли на третьи сутки, когда личинки перешли в стадию D-велигера, а затем через 1-2 сут. при помощи газ-сита с размерами ячеек меньшими, чем размеры личинок.

Корм личинкам подавали ежедневно, начиная с первой смены воды. В течение первой недели корм состоял из смеси микроводорослей *Monochrysis lutheri* (Droop, 1953) и *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) в соотношении клеток 1:1 суммарной концентрации 50 тыс. кл.·мл⁻¹. На второй неделе выращивания в состав корма была включена микроводоросль *Phaeodactylum tricornerutum* (Bohlin, 1897) (соотношение клеток 1:1:1), суммарная концентрация – 100 тыс. кл.·мл⁻¹. Затем, начиная с третьей недели, в состав корма добавили *Tetraselmis suecica* ((Kylin) Butcher, 1959) и *Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill et Wetherbee, 1989), суммарная концентрация 150–200 тыс. кл.·мл⁻¹.

Измерение линейных параметров личинок (длина *L*, мкм и высота *H*, мкм раковин; длины замкового края *l*, мкм) проводили при помощи микроскопа МБС-9 (× 56) с частотой 2-3 сут. (по 20 экз.) согласно ранее описанной методике [Loosanoff *et al.*, 1966; Scarlato *et al.*, 1990].

Средние значения и доверительные интервалы ($\pm i$) были подсчитаны в программе MS Excel; зависимости высоты раковины и длины замкового края от длины раковины личинок мидий выполнены в лицензионной программе “Диаграмма” (<https://diagram.slider-ai.ru/>) и представлены в виде уравнений.

Фотографии живых личинок мидий разных стадий развития сделаны при помощи фотокамеры Sony 7,2 Mega pixels и микроскопа МИК-МЕД-6 ($\times 80$).

Морфологию замкового края раковин личинок изучали с помощью электронного сканирующего микроскопа SEM Hitachi SU 3500 со встроенным программным обеспечением Oxford Ultin Max 65 для микроанализа. Препараты раковин готовили по методике, описанной ранее [Lutz *et al.*, 1982] в собственной модификации в следующей последовательности:

- живых личинок пипеткой переносили на стекло с луночкой;
- морскую воду заменяли дистиллированной и выдерживали в ней личинок в течение 30 минут;
- фиксировали в этаноле (96%) и до продолжения работы хранили при температуре 10°C;
- промывали в дистиллированной воде;
- переносили в 5% раствор гипохлорита натрия (NaOCl);
- после открытия створок, раковины личинок несколько раз промывали в дистиллированной воде;
- под микроскопом МБС-9 ($\times 28$) препаровальной иглой (austerlitz insects pins minutien 0,1 mm stainless) раковины переносили на предметный столик, покрытый двухсторонним скотчем;
- створки личинок наружной стороной приклеивали к предметному столику;
- препараты высушивали при комнатной температуре;
- затем покрывали в вакууме золото-палладиевым напылением.

Элементный состав определяли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии EDS(x). Данные представлены как спектры элементов, входящих в состав замкового края раковин личинок длиной: 104, 106, 117, 134, 150 и 225 мкм – по 1 экз.; 281 $\pm$ 3 мкм – 6 экз.; 297 $\pm$ 1 мкм – 3 экз.; 311 $\pm$ 7 мкм – 4 экз. и лиганента замкового края великонхи с “глазком”, размерами 278 $\pm$ 3 мкм – 3 экз. Регистрация рентгеновского излучения от каждой точки в процессе сканирования позволяет построить изображение, отражающее элементный состав различных участков поверхности. Количество каждого присутствующего элемента представлено в процентах (%) от абсолютной массы исследованного участка раковины. (Предварительно были исключены пики элементов напыления: золото и палладий). Достоверность

разницы концентрации элементов в замках левой и правой створках подсчитывали по критерию χ^2 [Lakin, 1973]. Все тесты проводились при 5% уровне значимости.

Результаты

Первую личиночную стадию мидии *M. galloprovincialis* – стерробластулу округлой формы, покрытую ресничками, можно было наблюдать через 13-15 часов после оплодотворения (Рис. 1А). Через 18-23 часа образовались реснички апикального султанчика. Личинка на этой стадии называется трохофорой (Рис. 1В).

На третьи сутки выращивания трохофора превратилась в характерную для двустворчатых моллюсков личинку – велигер D-формы с вельюмом (продиссоконх I), средние размеры которых составили: длина раковины – 110 $\pm$ 2 и высота – 82 $\pm$ 1 мкм. Замковый край раннего велигера размерами 105 мкм (возраст 3 сут.) (Рис. 2А) – прямой без зубчиков (Рис. 2А1). Наименьшие личинки мидий с прямым замком, выращенные в лабораторных условиях, имели размеры 98 $\times$ 77 мкм (возраст 3 сут.).

Структура провинкулума менялась в зависимости от размеров и формы раковины личинок. У велигеров длиной раковины 110 $\pm$ 2 мкм (возраст 3 сут.) раковина полукруглая, равносторонняя; длина замкового края составила 86 $\pm$ 1 мкм; провинкулум с зубчиками: по 2 латеральных и 18-центральных. Максимальная ширина замковой площадки составила 4,9 мкм; минимальная ширина в центральной части – 2,9 мкм (Рис. 2В; Рис. 2В1). По мере развития велигеров личиночный замок усложнялся, число зубов в замке увеличивалось, а латеральные зубчики становились значительно крупнее центральных. При длине раковины велигера 120 $\pm$ 1 мкм (возраст 5 сут.) длина замкового края составила 91 $\pm$ 1 мкм; провинкулум с 2 передними, 3 задними латеральными зубчиками и 19 – центральными (Рис. 2С; Рис. 2С1).

У прямозамковых велигеров размерами 134 $\pm$ 2 мкм (возраст 8 сут.) отмечена аналогичная морфология провинкулума; ширина замковой площадки по краям – 6 мкм, а в центре – 3 мкм (Рис. 3А; Рис. 3А1). У личинок длиной раковины 143 $\pm$ 2 мкм и высотой 114 $\pm$ 3 мкм (возраст 10 сут.) длина замкового края составила 92 $\pm$ 3 мкм; провинкулум с 3 латеральными рифлеными (шевронообразной формы) зубчиками и 17 центральными (Рис. 3В; Рис. 3В1). Отношение высоты к длине раковины составило 0,797.

По мере роста личинок центральные зубы провинкулума, разрастаясь вдоль замковой площадки, соединились, и у личинок с длиной раковины 190 $\pm$ 6 и высотой 161 $\pm$ 5 мкм (возраст

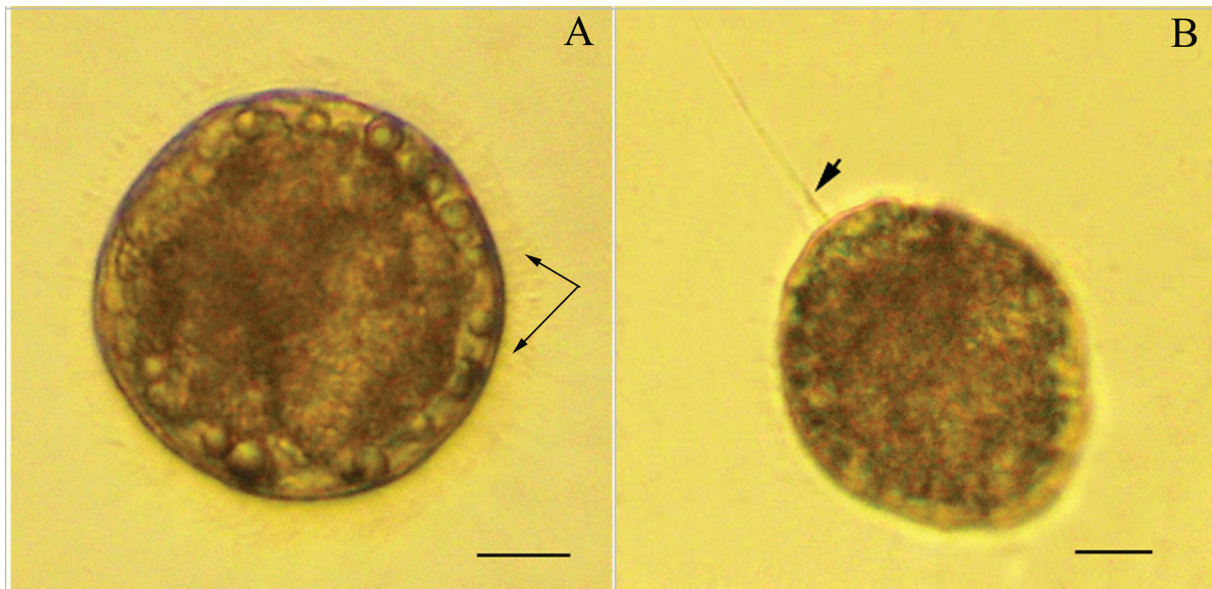


РИС. 1. Личинки мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадиях: **A** – стерробластулы (стрелками обозначены три ряда ресничек) и **B** – трохофоры (стрелкой обозначены реснички апикального султанчика). Масштаб: 15 мкм.

FIG. 1. Larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* at two different stages: (**A**) –sterroblastula (arrows indicate three rows of cilia) and (**B**) – trochophore (the arrow indicates cilia of the parietal plume). Scale: 15 µm.

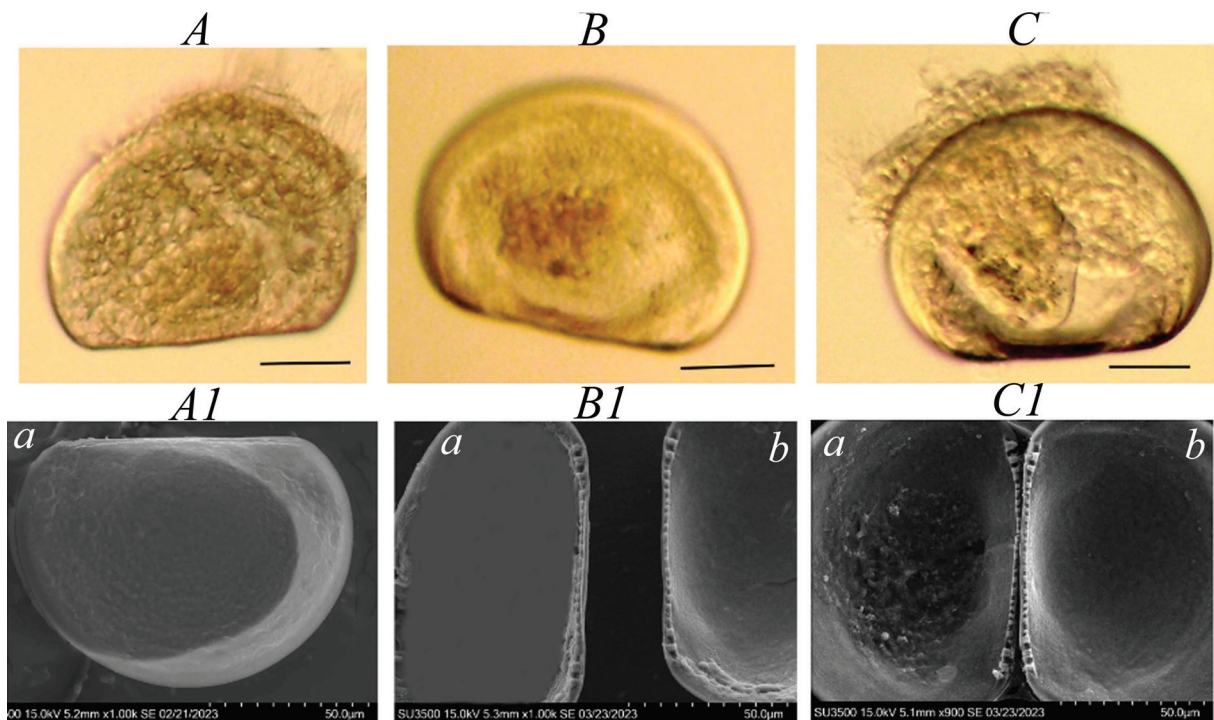


РИС. 2. Личинки мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадии велигера (**A** – 105 мкм; **B** – 110 мкм; **C** – 120 мкм). Масштаб: 30 мкм. **A1**; **B1**; **C1** – СЭМ - изображения замкового края раковины велигеров: *a* – левая створка; *b* – правая створка. (Описание в тексте).

FIG. 2. Larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* at the veliger stage (**A** = 105 µm, **B** = 110 µm, **C** = 120 µm). Scale: 30 µm. **A1**, **B1**, **C1** demonstrate SEM images of the hinge edge of the veliger shell: (*a*) left valve, (*b*) right valve (see description in text).

20 сут.) их количество уменьшилось до 15 (Рис. 4А; Рис. 4А1). Отношение высоты к длине раковины составило 0,847.

На стадии великонхи макушки раковин

хорошо развиты, задний край несколько шире переднего, раковина равностворчатая. У личинок длиной раковины 221 ± 6 и высотой – 192 ± 6 мкм (возраст 28 сут.) отношение высоты к длине рако-

Табл. 1. Метрические характеристики раковин личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* в онтогенезе.Table 1. Metric characteristics of shells of mussel *Mytilus galloprovincialis* larvae in ontogenesis.

№	Длина раковины, <i>L</i> , мкм	Высота раковины, <i>H</i> , мкм	Отношение <i>H/L</i>	Длина замкового края, <i>l</i> , мкм	Отношение <i>l/L</i>
1	110±2	83±1	0,755	86±1	0,782
2	120±1	91±2	0,758	90±1	0,750
3	134±2	105±2	0,784	91±2	0,680
4	143±3	114±3	0,797	92±3	0,643
5	164±4	135±4	0,823	98±3	0,597
6	190±6	161±5	0,847	105±3	0,553
7	221±6	192±6	0,869	115±4	0,520
8	253±8	224±7	0,885	131±4	0,518
9	275±6	246±4	0,895	142±5	0,516
10	296±6	267±6	0,902	151±5	0,510
11	326±7	297±5	0,911	165±5	0,506

вины составило – 0,869. Замковый край округлен; его длина составила 115±3 мкм. Замок одинаковый на обеих створках и состоит из 4 крупных латеральных и ряда прямоугольных центральных зубов (Рис. 4В; Рис. 4В1).

На 30 сутки выращивания у личинок мидий (размеры: $L = 253 \pm 8$; $H = 224 \pm 7$ мкм; отношение высоты к длине раковины – 0,885) появились “глазки” округлой (8×8 мкм) или овальной (12×8 мкм) формы, расположенные недалеко от центра, но ближе к заднему концу (Рис. 4С), в отличие от личинок *M. edulis* (Linnaeus, 1758), у которых “глазки” диаметром от 5 до 7 мкм появляются при размерах 215 мкм [Loosanoff *et al.*, 1966; Kulikova, Kolotukhina, 1989].

У великонхи с “глазком” длиной раковины 275±6 и высотой 246±4 мкм (возраст 34 сут.) длина изогнутого замкового края составила 142±4 мкм (Рис. 5А). Провинкулюм состоит из 6 передних и 6 задних латеральных зубов. За середиными зубчиками ближе к задним латеральным расположен овальный лигамент (Рис. 5А1).

С ростом личинок размеры “глазков” увеличивались и у педивелигеров они составили от 12×12 мкм (длина раковины – 296±6 мкм, возраст 37 сут.) до 16×14 мкм (длина раковины – 350±7 мкм, возраст 45 сут.). Провинкулюм педивелигера состоял из 6 передних и 7 задних латеральных зубов. Максимальная ширина замковой площадки составила 11,25 мкм; минимальная ширина – в центральной части – 4 мкм. На 45 сутки выращивания средние значения длины и высоты раковины личинок, готовых к метаморфозу, составили соответственно 350±9 и 321±5 мкм (отношение высоты к длине раковины – 0,917). После метаморфоза личинки прикрепилась к субстрату при помощи биссуса.

В таблице 1 представлена динамика метрических характеристик раковин личинок мидии *M. galloprovincialis*. Так, при размерах от 110 до 326

мкм, значения отношений высоты к длине раковины возрастали от 0,755 до 0,911, а отношения длины замкового края к длине раковины снижались от 0,782 до 0,506. Динамика отношений высоты к длине раковины и длины замкового края к длине раковины личинок указывает на изменение их формы в онтогенезе и даёт дополнительную информацию для их идентификации.

На Рис. 6А представлен график линейной зависимости высоты (H , мкм) от длины раковины личинок мидий: $H = 1,0022 \cdot L - 29,374$; $R^2 = 0,9879$; т.е. рост личинок подчиняется строгой аллометрии. Зависимость длины замкового края от длины раковины личинок адекватно описывается полиномом второй степени: $l = 0,0009 \cdot L^2 - 0,018 \cdot L + 77,78$; $R^2 = 0,9872$ (Рис. 6В), что можно объяснить изменением формы раковин при переходе личинок в последующую стадию развития. На графике видны два перегиба: переход от стадии прямозамкового велигера к стадии великонхи ($L < 175$ мкм) и переход к стадии педивелигера ($350 > L$, мкм ≥ 296).

Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии EDS(x) в замковом крае раковин личинок мидий определены следующие химические элементы: Ca, C, O, Na, Cl и Mg (Табл. 2). Прослеживается зависимость концентрации элементов от стадий развития личинок. Так, содержание кальция увеличивалось от 7,4 (вес, %) – в замковом крае D-велигера ($L = 104$ мкм) до 36,8 вес, % – в замковом крае великонхи ($L = 225$ мкм); у педивелигеров ($L \geq 298$ мкм) доля кальция составила 30 (вес, %). По мере развития личинок от стадии D-велигера ($L = 104$ мкм) до стадии великонхи с “глазком” ($L = 281 \pm 3$ мкм) концентрация углерода уменьшилась соответственно от 66,1 до 33,7 (вес, %). Доля кислорода в замковом крае велигеров колебалась в пределах от 22,1 ($L = 106$ мкм) до 33,7 вес, % ($L = 150$ мкм). У великонхи с “глазком” и педивелигеров концентрация кисло-

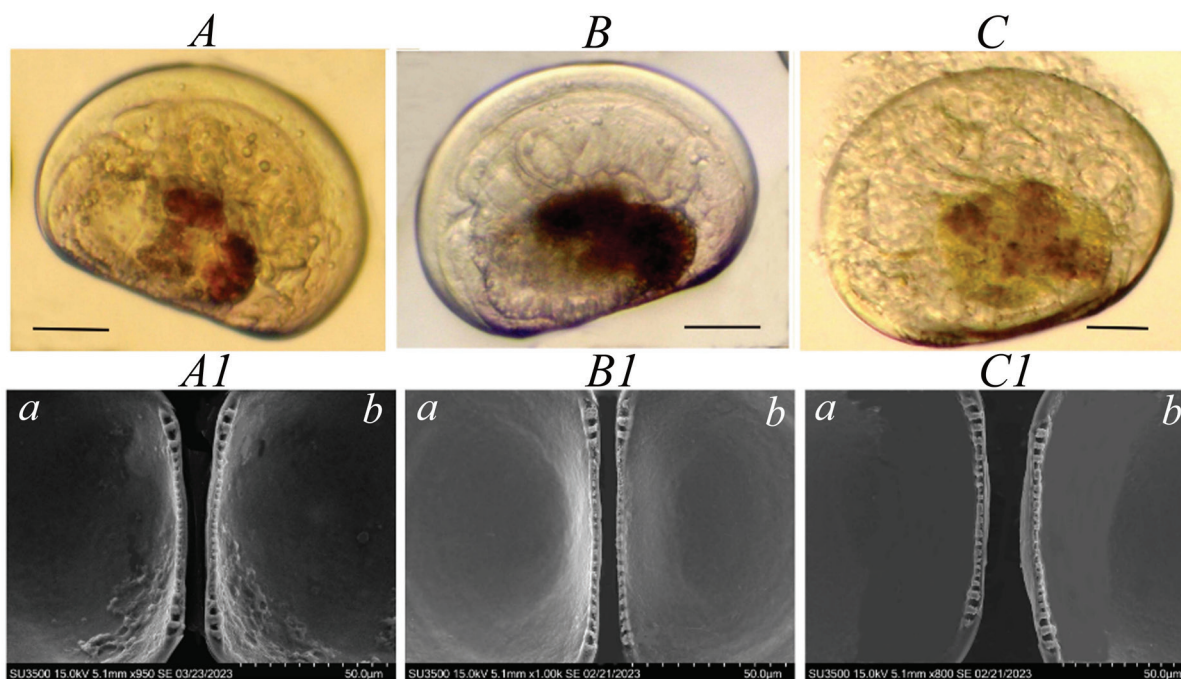


РИС. 3. Личинки мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадии велигера (**A** – 134,0 мкм; **B** – 143,0 мкм; **C** – 164,0 мкм). Масштаб: 30 мкм. **A1; B1; C1** – СЭМ-изображения замкового края раковины велигера: *a* – левая створка; *b* – правая створка. (Описание в тексте).

FIG. 3. Larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* at the veliger stage (**A** = 134.0 μ m, **B** = 143.0 μ m, **C** = 164.0 μ m). Scale: 30 μ m. **A1, B1, C1** demonstrate SEM images of the hinge edge of the veliger shell: (*a*) left valve, (*b*) right valve (see description in text).

рода оставалась на уровне 43 вес,%. Не зависимо от стадии развития личинок содержание натрия и хлора в замковом крае раковин оставалось примерно на одном уровне и составило десятые доли процента. Элемент магний ($2,8 \pm 0,5$ вес, %) определён только в замковом крае педивелигеров при длине раковины 311 ± 7 мкм.

Спектры элементного состава лигамента замкового края великонхи с “глазком” ($L = 275$ мкм) левой и правой створок представлены на Рис. 7. Элементы расположились по убыванию (вес, %) в следующей последовательности: С, О, Са, N, S, Cl, Na (Табл. 3). Равностворчатость раковин личинок *M. galloprovincialis* предполагает идентичное содержания элементов в замковом крае обеих створок. Как показало исследование, в замке левой створки концентрация элементов углерода, кислорода и азота несколько выше, чем правой, а элементы: кальций и сера более сконцентрированы в правой части замка (Табл. 3). Сравнение по критерию χ^2 показали, что различия в содержании аналогичных элементов в створках статистически не достоверны. В замке личинок мидий определена незначительная концентрация элементов Na и Cl. Присутствие этих элементов вероятно связано с наличием следов солей морской воды.

Обсуждение

Представленные в статье микрофотографии всех онтогенетических стадий развития личинок мидии *M. galloprovincialis* от D-велигера до педивелигера, показывают тонкие различия морфологии раковины различных личиночных стадий, а также морфологические изменения личиночного замкового аппарата на разных стадиях развития. Использование трёх линейных критериев: длины и высоты раковины, и длины замкового края личинок, а также зависимостей: высоты от длины раковины и длины замкового края от длины раковины, даёт возможность с высокой достоверностью идентифицировать личинок *M. galloprovincialis* из планктона, начиная с ранних стадий. Так, при длине раковины велигеров 120 ± 1 мкм фактические значения высоты раковины и длины замкового края личинок мидий составили соответственно: 91 ± 2 и 90 ± 1 мкм (Табл. 2). Применяя формулы зависимости высоты раковины и длины замкового края от длины личинок, определяем высоту раковины (90,89 мкм) и длину замкового края (88,56 мкм) личинок длиной раковины 120 мкм. Разница между теоретически определёнными и фактически полученными параметрами находится в пределах границы доверительных интервалов.

Форму раковины личинок и морфологию

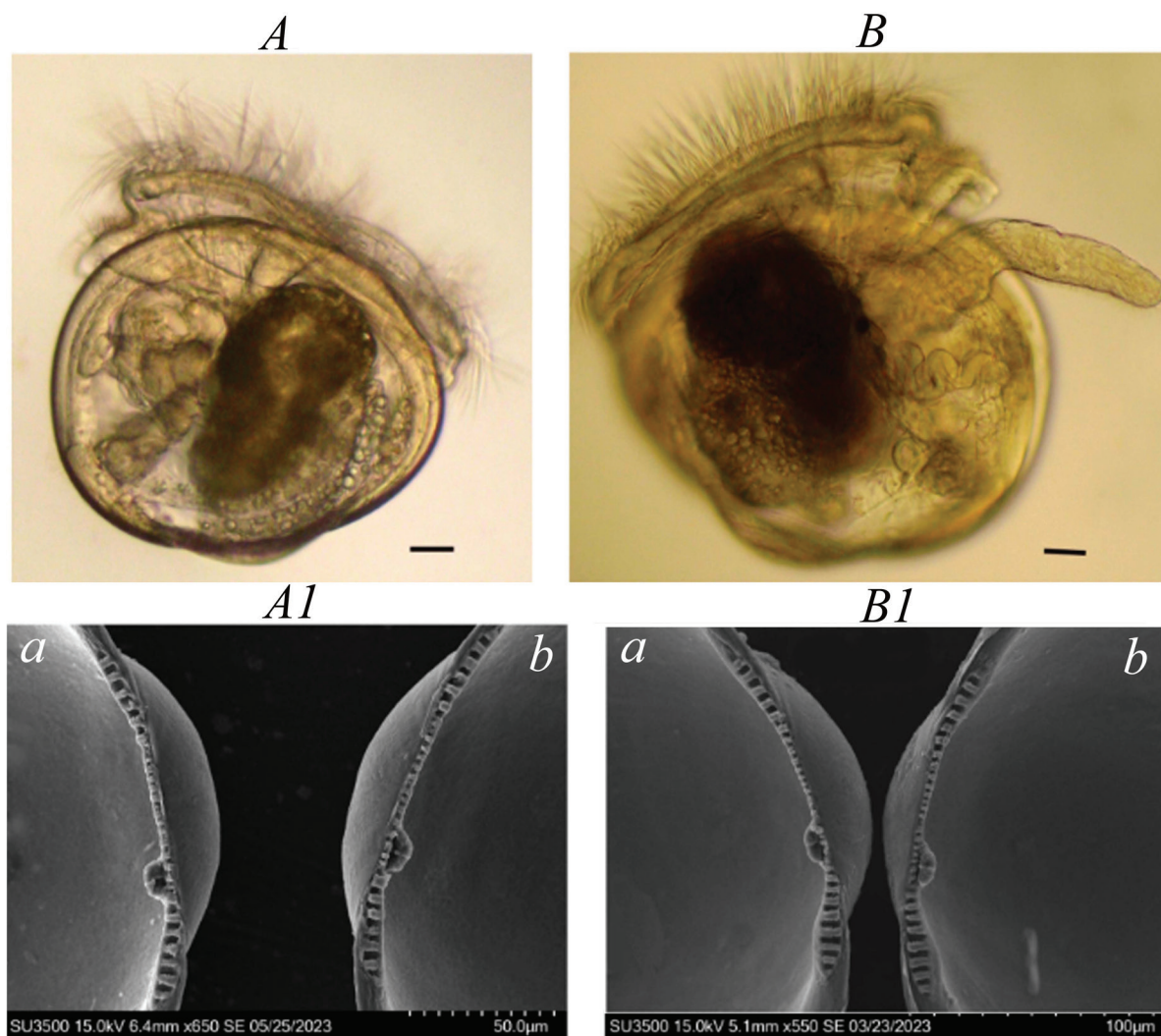


РИС. 5. Личинки мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадии великонхи с “глазком” (*A* – 275,0 мкм) и педивелигера (*B* – 296,0 мкм). Масштаб: 30 мкм. *A1* и *B1* – СЭМ - изображения замкового края створок великонхи с “глазком” и педивелигера: *a* – левая створка; *b* – правая створка. (Описание в тексте).

FIG. 5. Larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* at the stage of veliconcha with an “eye” (*A* – 275.0 μm) and pediveliger (*B* – 296.0 μm). Scale: 30 μm . *A1* and *B1* – SEM images of the hinge edge of the valves of the veliconcha with an “eye” and the pediveliger: *a* – left valve; *b* – right valve. (Description in text).

латеральных зубчиков с каждой стороны и 15-20 центральных мелких [Kulikova, Kolotukhina, 1989].

Продолжительность стадий развития личинок мидий *M. galloprovincialis* и их размеры зависят от условий выращивания: температуры воды, состава корма, концентрации микроводорослей и плотности посадки личинок [Lagos *et al.*, 2013; Kholodov *et al.*, 2017]. Продолжительность выращивания личинок мидий от оплодотворения до метаморфоза может составлять от 18 [Moussaoui *et al.*, 2021] до 31 [Kholodov *et al.*, 2017] или 50 сут. [Le Pennec, Masson, 1976]. Известно, что существует обратная зависимость между плотностью посадки личинок и их размерами, что свидетельствует о том, что конкуренция, зависящая от плотности, может снижать рост личинок в условиях

питомника [Weston *et al.*, 2021]. При оптимальных значениях температуры воды (20°C), но низкой концентрации корма из двух видов микроводорослей: *Monochrysis lutheri* и *Tetraselmis suecica*, продолжительность выращивания личинок до метаморфоза ($L=320$ мкм) составила 50 суток [Le Pennec, Masson, 1976]. В настоящем исследовании при оптимальных значениях плотности посадки личинок, концентрации и состава корма [Kholodov *et al.*, 2017], но температуре воды ниже оптимальных значений (14-16°C), процесс метаморфоза начался на 45 сут. выращивания ($L\geq 350$ мкм), в отличие от личинок *M. edulis*, у которых метаморфоз начинается при размерах 260 мкм [Bayne, 1965; Kulikova, Kolotukhina, 1989].

С эмбриональной точки зрения раковина

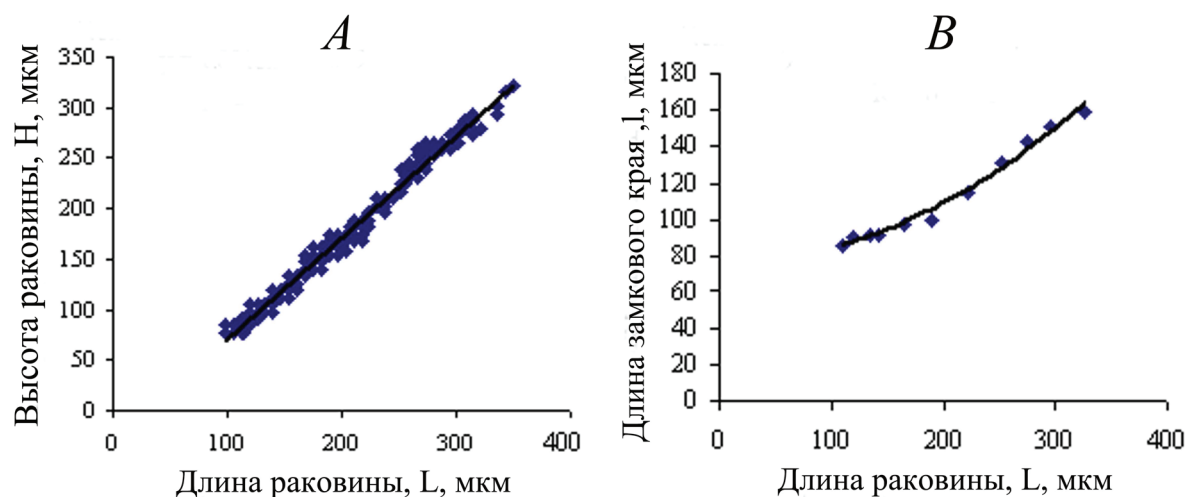


РИС. 6. Графики зависимости: *A* – высоты (H, мкм) от длины (L, мкм) раковины личинок; *B* – длины замкового края (l, мкм) от длины раковины личинок *Mytilus galloprovincialis* в онтогенезе.

FIG. 6. Graphs of the correlations: (A) height (H, μm) vs. length (L, μm) of the larval shell, (B) hinge edge length (l, μm) vs. length of *Mytilus galloprovincialis* larval shells in ontogenesis

двустворчатых моллюсков имеет эктодермальное происхождение. Её формирование начинается на ранних стадиях и зависит от закономерностей постэмбриональных процессов развития [Marin *et al.*, 2012]. У личинок высокая экспрессия карбоангидразы предшествует формированию раковинного поля на стадии гастролы, образованию раковинной железы и периостракума на стадии трохофоры и отложению минералов – на стадии продиссоконха [Medaković, 2000]. Раковинное поле выделяет органический матрикс, который обеспечивает основу для отложения минералов во время морфогенеза раковины [Marin *et al.*, 2008]. Органический матрикс в основном состоит из хитина и кислых полисахаридов, белков и гликопротеинов, которые играют важную роль в различных аспектах формирования раковины, таких как отложение CaCO_3 , рост и выбор полиморфов [Miglioli *et al.*, 2019]. Известно, что у двустворчатых моллюсков минерализация каждой створки раковины начинается вдоль замковой линии, включая её центр [Kniprath, 1980]. Как было подтверждено при изучении элементного состава замкового края методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии EDS(x), минерализация раковины личинок *M. galloprovincialis* также начинается в замковом крае. В замковом крае D-велигера ($L=104$ мкм, возраст 3 сут.) определён элемент $[\text{Ca}^{2+}]$ концентрации 7,4 вес, %. По мере роста личинок концентрация кальция увеличивалась и в замковом крае D-велигера, но уже с двумя зачаточными латеральными зубчиками ($L=106$ мкм; возраст 3 сут.) она составила 17,8 вес, % (Табл. 2). Максимальное содержание кальция выявлено в замковом крае личинок на стадии

Табл. 3. Химический состав лигамента замкового края раковины личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадии великонхи с “глазком” ($L = 278 \pm 3$ мкм).

Table 3. Chemical composition of shell hinge edge ligament of mussel *Mytilus galloprovincialis* larvae at the “eyed” veliconcha stage ($L = 278 \pm 3$ μm).

Химические элементы	Левая створка		Правая створка	
	Вес, %	±i	Вес, %	±i
C	34,7	0,1	34,2	0,9
O	28,0	1,8	27,5	0,1
Ca	24,6	1,9	25,6	0,6
N	8,6	0,2	8,4	0,0
S	3,4	0,2	3,7	0,1
Cl	0,4	0,1	0,3	0,0
Na	0,3	0,1	0,3	0,1

великонхи – 36,8 вес, %. Наличие $[\text{Ca}^{2+}]$ в составе элементов раковин личинок *M. galloprovincialis* более ранних стадий развития, выращенных на средиземноморской воде [Miglioli *et al.*, 2019; Medaković, 2000], очевидно связано с более высокой солёностью воды (34‰), по сравнению с черноморской (18‰). Так, при изучении элементного состава раковин *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) было установлено, что накопление $[\text{Ca}^{2+}]$ и других ионов, необходимых для формирования раковины, а также условия, влияющие на процесс кальцификации, зависят от солёности воды [Sillanpää *et al.*, 2020].

У мидий раковина состоит из трёх слоев: внешнего тонкопризматического слоя кальцита и двух внутренних слоёв арагонитового перламутра

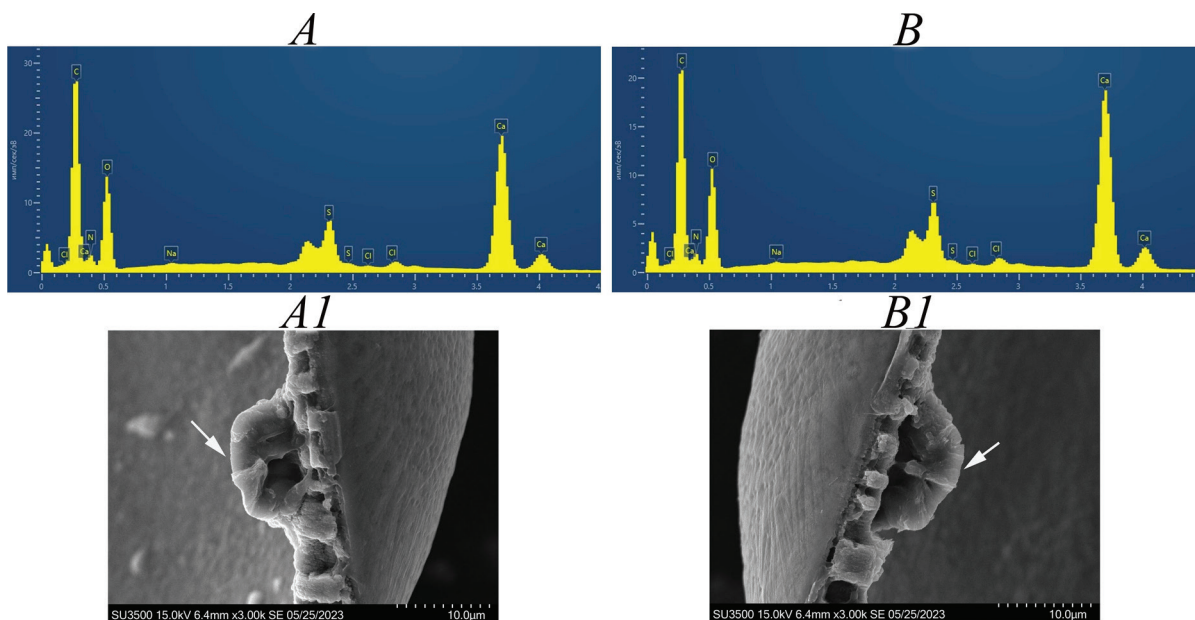


РИС. 7. Спектры энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС(х)) лигамента замкового края (обозначено стрелками) левой (**A**, **A1**) и правой (**B**, **B1**) створок раковины личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* на стадии великонхи с “глазком”.

FIG. 7 Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectra of the ligament of the hinge edge (indicated by arrows) of the left (**A**, **A1**) and right (**B**, **B1**) shell valves of mussel *Mytilus galloprovincialis* larvae at the “eyed” veliconcha stage.

[Kennedy *et al.*, 1969]. Регуляция полиморфизма арагонита-кальцита в организмах зависит от концентрации ионов магния [Falini *et al.*, 1996]. В составе элементов замкового края педивелигеров длиной раковины 311 ± 7 мкм был определён магний концентрации $2,8 \pm 0,5$ вес, % (Табл. 2). Вероятно, закладка перламутрового слоя в раковинах *M. galloprovincialis* начинается в замковом крае педивелигеров.

Элементный состав лигамента личинок мидии на стадии великонхи с “глазком” ($L=278 \pm 3$ мкм) расположился по убыванию (вес, %) в следующей последовательности: C, O, Ca, N, S, Cl, Na (Табл. 3). В литературе описаны два основных источника поступления карбонат-ионов: метаболический и неорганический [MacDonald, 2011]. Метаболические ионы $[\text{CO}_3^{2-}]$ попадают в экстрапаллиальную жидкость путем диффузии из тканей мантии, где подвергаются гидратации и гидроксилированию с образованием бикарбоната. Неорганический углерод в виде ионов бикарбоната $[\text{HCO}_3^-]$, растворённый в окружающей морской воде, включается в экстрапаллиальную жидкость путём обмена, где происходит его депонирование. Углерод, включённый в минеральную структуру, представляет собой комбинацию метаболического и растворённого в воде углерода [MacDonald, 2011]. В гемолимфе *M. galloprovincialis*, как и *C. gigas*, кальций может транспортироваться несколькими путями: как свободный $[\text{Ca}^{2+}]$, связанный с Ca-связывающими белками, или

небольшими органическими молекулами, так и специализированными клетками – гемоцитами [Sillanpää *et al.*, 2016]. Сообщалось, что сера участвует в дисульфидных связях адгезивных белков нескольких морских организмов: в цементном белке устрицы *C. gigas* [Foulon *et al.*, 2018] и *Phragmatopoma californica* (Fewkes, 1889) [Sagert *et al.*, 2006] и в биссусе мидии *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) [Sagert *et al.*, 2006]. Ранее установлено, что сера, предположительно, в форме сульфата, присутствует в месте зарождения кристаллов при формировании раковины [Addadi *et al.*, 1987], а сульфат является основным компонентом внутрипризматической органической матрицы [Dauphin *et al.*, 2003].

Таким образом, выявленные морфометрические особенности раковин и замкового края личинок *M. galloprovincialis* в онтогенезе, а также установленная зависимость высоты раковины и длины замкового края от длины раковин личинок разных стадий развития, могут стать основой для их идентификации в пуле личинок других видов двустворчатых моллюсков из планктона Чёрного моря. Элементный состав замкового края раковин личинок на стадиях D-велигера, велигера, великонхи и педивелигера, определенный с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии EDS(х), показал наличие кальция, углерода, кислорода, натрия и хлора. Магний определён только в замковом крае педивелигеров.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией микроскопии ФИЦ ИнБЮМ В.Н. Лишаеву за оказанную помощь в работе на СЭМ. Авторы признательны рецензентам за замечания и ценные советы, которые улучшили содержание рукописи.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов” (№ гос. регистрации 124022400152-1).

Литература

- Addadi L., Joester D., Nudelman F., Weiner S. 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry*, 12: 980–987.
- Bayne B.L. 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2: 1–47. DOI:10.1080/00785326.1965.10409596
- Dauphin Y., Cuif J.P., Doucet J., Salome M., Susini J., Williams C.T. 2003. In situ chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *Journal Structural Biology*, 142: 272–280.
- Falini G., Albeck S., Weiner S., Source L.A. 1996. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science, New Series*, 271(5245): 67–69.
- Foulon V., Artigaud S., Buscaglia M., Bernay B., Fabioux C., Petton B., Elies P., Boukerma K., Hellio C., Guérard F., Boudry P. 2018. Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae. *Scientific Reports*, 8: 15298.
- Kennedy W.J., Taylor J.D., Hall A. 1969. Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Biological Reviews*, 44: 499–530. DOI:10.1111/j.1469-185X.1969.tb00610.x
- Kiseleva M.I. 1981. *Benthos of loose sediments of the Black Sea*. Kiev: Naukova Dumka, 164 p. [In Russian].
- Kholodov V.I., Pirkova A.V., Ladygina L.V. 2017. *Cultivating mussels and oysters in the Black Sea*. 2nd. edition, expanded. Ryabushko V.I. (Ed.). Voronezh: OOO “Izdat-Print”, 508 p. [In Russian].
- Kniprath E. 1980. Larval development of the shell and the shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Roux's Archives of Developmental Biology*, 188: 201–204. DOI: 10.1007/BF00849049
- Kulikova V.A., Kolotukhina N.K. 1989. *Pelagic larvae of bivalve molluscs of the Sea of Japan, Methods, morphology, identification. Preprint No 21*. Vladivostok: Far-East Branch of the Academy of Sciences of the USSR, 1–60 [In Russian].
- Lagos L., Herrera M., Sánchez-Lazo C., Martínez-Pita I. 2013. Effect of larval stocking density on growth, survival and whole body cortisol of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) larvae reared under laboratory conditions. *Aquaculture research*, 46(7): 1648–1656. DOI:10.1111/are.1231
- Lakin G.F. 1973. *Biometrics*. Moscow: Vysshaya Shkola, 343 p. [In Russian].
- Le Pennec M., Masson M. 1976. Morphogenèse de la coquille de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) élevé au laboratoire. *Cahiers de biologie marine*, 17:113–118.
- Lisitskaya E.V. 2001. Seasonal dynamics of meroplankton in the waters of an experimental mussel farm (Sevastopol, Black Sea). *Ecologiya morya*, 55: 83–86 [In Russian].
- Lisitskaya E.V. 2017. Taxonomic composition and seasonal dynamics of meroplankton in the area of mussel-oyster farm (Sevastopol, Black Sea). *Marine Biological Journal*, 2(4): 38–49 [In Russian]. DOI: 10.21072/mbj.2017.02.4.04
- Loosanoff V.L., Davis H.C., Chanley P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*, 4(2): 351–435.
- Lutz R., Goodsell M., Castagna S., Chapman C., Newell H., Hiou R., Mann D., Jablons K.J., Kennedy S., Siddall R., Goldberg H., Beattie C., Famagne A., Chestnut A. 1982. Preliminary observation on the usefulness of hinge structures for identification of bivalve larvae. *Journal of Shellfish Research*, 2(1): 65–72.
- MacDonald J. 2011. Microstructure, crystallography and stable isotope composition of *Crassostrea gigas*. PhD thesis University of Glasgow. <http://theses.gla.ac.uk/2939/>
- Marin F., Luquet G., Marie B., Medaković D. 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology*, 80: 209–176. DOI: 10.1016/S0070-2153(07)80006-8
- Marin F., Roy N.L., Marie B. 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, 4: 1099–1125.
- Medaković D. 2000. Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. *Helgoland Marine Research*, 54: 1–6.
- Miglioli A., Dumollard R., Balbi T., Besnardeau L., Canesi L. 2019. Characterization of the main steps in first shell formation in *Mytilus galloprovincialis*: possible role of tyrosinase. *Proceedings: Biological Sciences*, 286(1916): 20192043. DOI: 10.1098/rspb.2019.2043
- Moussaoui M.A.E., Ouagajjou Y., Aghzar A., Chattou E.M.A., Saoud Y., Nhhala H. 2021. Feeding and growth coupling during different development larvae phases of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* L. from Amsa Bay. *Published online, E3S Web of Conferences*, 298: 03007. DOI:10.1051/e3sconf/202129803007
- Pirkova A.V., Ladygina L.V., Shchurov S.V. 2019. Formation of settlements of the mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) on collectors of the Laspi Bay depending on environmental factors. *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya*. 5(71), No. 1: 92–106 [In Russian].
- Sagert J., Sun C., Waite J. H. 2006. Chemical subtleties of mussel and polychaete holdfasts. In: Smith A.M., Callow J.A. (eds.). *Biological Adhesives*. Springer, Berlin: 125–145.
- Scarlato O.A., Starobogatov Ya.I. 1972. Class of bivalve mollusks – Bivalvia. In: Vodyanitskyi V.A., Mordukhai-Boltovskoi F.D. (eds.). *Key to the fauna*

- of the Black and Azov Seas. Kiev: Naukova Dumka: 178–250 [In Russian].
- Scarlato O.A., Starobogatov Ya.I., Antonov N.I. 1990. Shell morphology and microanatomy / Methods for studying bivalves. *Trudy Zoologicheskogo Instituta AN SSSR*, Leningrad, 219: 4–32 [In Russian].
- Sillanpää J.K., Ramesh K., Melzner F, Sundh H., Sundell K. 2016. Calcium mobilisation following shell damage in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 27: 75–83.
- Sillanpää J.K., Reis Cardoso J.C, Félix R.C., Anjos L., Power D.M., Sundell K. 2020. Dilution of seawater affects the Ca^{2+} transport in the outer mantle epithelium of *Crassostrea gigas*. *Frontiers in Physiology*, 11: 1. DOI: 10.3389/fphys.2020.00001
- Weston K., Jahangard S., Ingram B.A., Miller A.D., Jennings G., Sherman C.D.H. 2021. Factors affecting settlement, growth and metamorphosis of hatchery-produced Australian blue mussel larvae. *Aquaculture International*, 29: 1963–1977.
- Zakhvatkina K.A. 1972. Larvae of bivalve mollusks – Bivalvia. In: Vodyanitskyi V.A., Mordukhai-Boltovskoi F.D. (eds) *Key to the fauna of the Black and Azov Seas*. Kiev: Naukova Dumka: 250–271 [In Russian].

