

УДК 594.121-147.124:57.01

УЛЬТРАСТРУКТУРА РАКОВИН ДИПЛОИДНЫХ И ТРИПЛОИДНЫХ УСТРИЦ *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG 1793) (BIVALVIA, OSTREIDAE), ВЫРАЩЕННЫХ В ЧЁРНОМ МОРЕ

© 2023 г. А. В. Пиркова^{а, *}, Л. В. Ладыгина^{а, **}

^аФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН,
пр. Нахимова, 2, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: avpirkova@mail.ru

**e-mail: lvladygina@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 07.07.2023 г.

Проведено сравнение ультраструктуры ростового края раковин диплоидных и триплоидных устриц (*Crassostrea gigas* Thunberg 1793), выращенных до товарного размера на морской ферме у берегов Крыма. Диплоидные устрицы – осевшие из планктона, триплоидные – получены в питомнике атлантического побережья. При исследовании использован электронный сканирующий микроскоп SEM Hitachi SU 3500 со встроенным программным обеспечением Oxford Ultin Max 65 для микроанализа. Показано, что ростовой край раковин состоит из двух слоев: периостракума и призматического слоя. Периостракум диплоидных устриц гладкий, пористый. Периостракум триплоидных устриц объемный, с продолжными складками. Призматический слой как правой, так и левой створки раковин состоит из призм, окруженных органическими оболочками. В отличие от диплоидных, у триплоидных устриц грани призм длиннее, кальцитовое заполнение значительно ниже нормы, а межпризматические органические оболочки прерывистые с включениями карбоната кальция. Доля органического вещества в раковинах диплоидных устриц достоверно выше, чем в раковинах триплоидных. Обсуждаются факторы, влияющие на ультраструктуру раковин устриц разной ploidy.

Ключевые слова: ростовой край створки, ploidy, тонкая морфология, химический состав

DOI: 10.31857/S004451342309009X, **EDN:** REMWAA

Ареал обитания устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) – Охотское, Японское, Жёлтое, Восточно- и Южно-Китайское моря (Раков, 1987). В 60–70-е годы XX в. гигантская устрица была завезена на Атлантическое побережье Европы и западное побережье США, где в дальнейшем стала доминирующим видом, как среди природных популяций двустворчатых моллюсков, так и в аквакультуре (Helm, 2004; Troost, 2010; Dauphina et al., 2013). *C. gigas* выращивают во многих странах Европы, Азии, Африки, Австралии и Америки. Спат устриц собирают на коллекторы в период максимальной численности личинок в планктоне, а также получают при разведении в питомниках. Значительная часть мирового производства морских моллюсков, особенно в Европе и Америке, приходится на долю гигантской устрицы, благодаря ее высокому темпу росту и адаптации к широкому диапазону условий окружающей среды (Troost, 2010). Начиная с 2010 г., мировое производство *C. gigas* увеличилось на 22% и в 2016 г. достигло около 600 тыс. т (FAO, 2018).

В Чёрное море *C. gigas* была интродуцирована в начале 80-х годов XX в. взамен исчезающего вида *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758) (Орленко, 2005). Моллюсков разного размера (преимущественно спат) доставляли из Японского моря на побережье Чёрного моря. Аклиматизация проводилась согласно государственной программе, с прохождением моллюсков через карантин с последующим расселением по многим экспериментальным морским фермам. Устрицы хорошо адаптировались к черноморским условиям, о чем можно было судить по их темпу роста и выживаемости.

В настоящее время на черноморском побережье России функционируют три десятка марихозяйств с применением биотехники полуциклического выращивания *C. gigas*. Для этого спат диплоидных и триплоидных устриц закупают в питомниках атлантического побережья либо спат диплоидных устриц, осевший на искусственные субстраты в морях Дальнего Востока, подращивают в садках в течение двух лет до товарного размера. За этот пе-

риод диплоидные устрицы *C. gigas* дважды нерестятся в природных условиях, т.к. половозрелыми они становятся в первый год жизни (Раков, 1987). В Чёрном море гигантских устриц все чаще обнаруживают на твердых субстратах дна, конструкция морских ферм и раковинах других видов двустворчатых моллюсков (Пиркова и др., 2020).

Товарная привлекательность устриц зависит от целостности и прочности раковины, которая защищает мягкие ткани моллюсков от воздействия внешних факторов и хищников (Suzuki et al., 2017). Известно, что раковины устриц состоят из карбоната кальция (CaCO_3) двух форм кристаллизации: кальцита и арагонита. Арагонит в раковине устриц находится только в месте прикрепления мускула аддуктора (миостракальный слой) и в замковом крае раковины (Galtsoff, 1964). Неорганическая часть раковины гигантских устриц составляет от 95 до 99% их веса (Suzuki et al., 2017; Song et al., 2019). Органическая часть раковины (матрица) представляет собой смесь белков, полисахаридов, гликопротеинов, липидов, пигментов, свободных аминокислот и пептидов, выделяемых тканями моллюска в процессе скелетогенеза; причем белки являются основными макромолекулами, контролирующими синтез биокристаллов (Marin et al., 2012; Mouchi et al., 2016). Несмотря на то, что органическая матрица составляет незначительную часть раковины моллюска, она является одним из основных компонентов, ответственных за прочность раковины (Marin et al., 2012).

В формировании раковины участвуют край мантии и внешний эпителиальный слой всей мантии. Раковина соприкасается с мантией через экстрапаллиальную жидкость, которая снабжает периостракум и кальцинированные слои неорганическими ионами и органическими веществами (Waller, 1980). Ионы кальция поглощаются из пищи при фильтрации воды или в результате пассивной диффузии через все органы. Впоследствии эти ионы переносятся клетками гемолимфы и могут временно накапливаться в соединительных тканях мантии или в эпителии мантии (Marin et al., 2012). В гемолимфе устриц есть две основные формы амебодных клеток: агранулоциты и гранулоциты. Гранулоциты доставляют кристаллы CaCO_3 к месту образования раковины и участвуют в формировании призматического слоя и кристаллизации кальция (Song et al., 2019).

Раковина *C. gigas*, как и у других двустворчатых моллюсков, имеет многослойное органо-минеральное строение (Marie et al., 2011). Первым формируется периостракум, который покрывает внешнюю поверхность раковины и состоит в основном из органического матрикса. Периостракум секретируется специализированными клет-

ками периостракальной борозды и выделяется в виде жидкости. Жидкость состоит из нестабильных растворимых предшественников, которые богаты тирозином и становятся не растворимыми при попадании во внеклеточную среду (Marin et al., 2012). Один из растворимых предшественников был выделен из периостракума *Mytilus edulis* (Lamarck 1819). Это вещество, частично охарактеризованное и описанное как периострацин, содержит 55% остатков глицина, 10% тирозина и 2.2% ДОФА (3,4-дигидроксифенилаланин) (Waite et al., 1979). Периостракум обеспечивает первичную матрицу для внеклеточной минерализации раковины и роста кристаллов; разграничивает и герметизирует замкнутое пространство между тканями мантии и самой раковинной (экстрапаллиальное пространство) и защищает раковину от растворения (Marin et al., 2012).

Под периостракумом формируется призматический слой. Этот слой состоит из кристаллов кальцита, окруженных органическим каркасом и ориентированных перпендикулярно к поверхности раковины (Suzuki et al., 2017). Высота призм правой створки *C. gigas* составляет от 20 до 200 мкм и ширина – от 5 до 40 мкм. Призмы левой створки всегда меньше, и их размеры варьируют от 11 до 31 мкм в высоту и 9.5–17.7 мкм в ширину (Marie et al., 2011). Установлено, что каждая призма, в свою очередь, состоит из субъединиц (<~200 нм) и органических макромолекул (Dauphina et al., 2013). На внутренней части раковин простые призмы имеют характерную “сотовую” структуру с органической мембраной, разделяющей карбонатные единицы. Толщина органической мембраны у большинства видов устриц варьирует от 0.5 до 8 мкм (Kennedy et al., 1969). Описаны два способа образования межпризматических мембран (Chesa et al., 2005). На начальном этапе организации этих мембран весь внешний эпителий мантии выделяет органическую жидкость, покрывающую всю поверхность. В дальнейшем межпризматические мембраны образуются в результате выделения секрета особыми эпителиальными клетками внешнего края мантии. Органические мембраны затвердевают в результате полимеризации. Вскоре после формирования зачаточных органических полостей в них начинается рост монокристаллов кальцита, которые выравнивают секретированную поверхность органических мембран (Chesa et al., 2005). Согласно результатам многих исследований, отложение минералов в биологических тканях – это контролируемый процесс. Среди наиболее активных агентов, контролирующих биологическую минерализацию, есть группы кислых белков, богатых аспарагиновой кислотой, серином или глицином (Weiner, Addadi, 1991). Они могут специфически взаимодействовать с некоторыми гранями кристалла, вызывая ориентированное отложение кристаллов

(nucleation), или внедряться в саму кристаллическую решетку.

Все эти сведения о структуре раковин были получены при исследовании диплоидных гигантских устриц.

Цель настоящего исследования – сравнение морфометрических характеристик, ультраструктуры ростового края и содержания органического и неорганического вещества в раковинах устриц *C. gigas* диплоидных – черноморского происхождения и триплоидных – атлантического побережья, выращенных до товарного размера в идентичных условиях на морской ферме Чёрного моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для работы послужили диплоидные и триплоидные устрицы *C. gigas* возрастом 2.5 года (высота раковин диплоидных устриц от 86.76 до 121.06 мм; триплоидных – от 89.04 до 131.20 мм), выращенные в подвесной культуре в садках на морской ферме (внешний рейд Севастопольской бухты: 44°37'13.4" N, 33°30'13.6" E). Спат диплоидных устриц размерами 10–12 мм был обнаружен в 2019 г. на раковинах двустворчатого моллюска анадары (*Anadara kagoshimensis* (Tokunaga 1906)), подращиваемой в садках на ферме. Спат триплоидных устриц размерами около 12 мм был приобретен в 2019 г. ООО НИО “Марикультура” в устричном питомнике, расположенном на атлантическом побережье.

Линейные характеристики устриц (высоту, длину, ширину) измеряли цифровым штангенциркулем (ШЦ-1 “Зубр”, с точностью до 0.01 мм) согласно методике (Almeida et al., 1998). Раковины взвешивали на электронных весах AXIS ANG200C (до 0.0001 г). Рассмотрены особенности изменения индексов сагиттальной (H/L), фронтальной (D/L) кривизны и выпуклости ($(H + D)/L$) раковин (Harding, Mann, 2006). Для весовых и размерных характеристик устриц приводятся средние арифметические значения со стандартными отклонениями и 95% доверительные интервалы средних.

Долю органического вещества в правых (верхних) и левых (нижних) створках раковин диплоидных и триплоидных устриц определяли как разницу веса до и после сжигания и представили в процентах от веса створок. Образцы раковин сжигали в муфельной печи “ТЕМОС-Экспресс” при 450°C (температура, при которой происходит разложение органической матрицы) в течение 5 час (по три навески правой и левой створок; всего 36 навесок) после предварительного механического измельчения и высушивания в сушильном шкафу в течение 42 час при 45°C согласно методике (Soisuwan et al., 2014).

Для изучения ультраструктуры створки раковин тщательно промывали в проточной, затем дистиллированной воде и сушили на воздухе. Детальный ультраструктурный и химический анализ ростового края (рис. 1) правых и левых створок диплоидных и триплоидных устриц проводили с помощью электронного сканирующего микроскопа SEM Hitachi SU 3500 со встроенным программным обеспечением Oxford Ultin Max 65 для микроанализа. Регистрация рентгеновского излучения от каждой точки в процессе сканирования позволяет построить изображение, отражающее элементный состав различных участков поверхности. Такие изображения называют картами элементного состава (Pirozzi et al., 2018).

Плоидность определяли индивидуально как для диплоидных, так и для триплоидных устриц, анализируя метафазы митоза эпителиальных клеток жабр с удовлетворительным расположением хромосом с помощью микроскопа “Axioskop 40” C.ZEISS, фотокамеры “CanonPowerShot A640” и программного обеспечения “AxiVision Rel. 4.6”. Фотографии метафаз митоза были обработаны в Adobe Photoshop (версия 3) при использовании контраста, оптимизации цвета и фильтра. Постоянные препараты готовили согласно методике (Дарлингтон, Ла Кур, 1980). Для этого кусочки тканей жабр промывали дистиллированной водой, обрабатывали гипотоническим раствором (0.03 М лимоннокислого натрия) при температуре 60°C в течение 30 мин и фиксировали в смеси этилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1). Смену фиксатора проводили дважды: через 30 мин и 2 часа. Для приготовления клеточной суспензии ткани измельчали в 50% растворе уксусной кислоты; на предметное стекло наносили несколько капель суспензии; распределяли тонким слоем и высушивали на воздухе в течение суток. Препараты окрашивали разбавленным раствором Гимзы в течение 2–4 часов. Затем промывали дистиллированной водой, высушивали и заключали в hydro-matrix.

Значимость различия веса раковин диплоидных и триплоидных устриц и значимость различия содержания органического вещества в раковинах проводили по U-критерию Манна–Уитни (Гублер, Генкин, 1973):

$$U_{\text{эмп}} = n_x n_y + \frac{n_{\text{max}}(n_{\text{max}} + 1)}{2} - T,$$

где: n_x и n_y – объемы выборок;

n_{max} – объем выборки, имеющей большую ранговую сумму;

T – большая сумма рангов из выборки x и y .

При этом различия между двумя выборками считаются значимыми, если $U_{\text{эмп}} \leq U_{0.05}$.

Сравнение средних значений доли органического вещества в правых створках диплоидных и

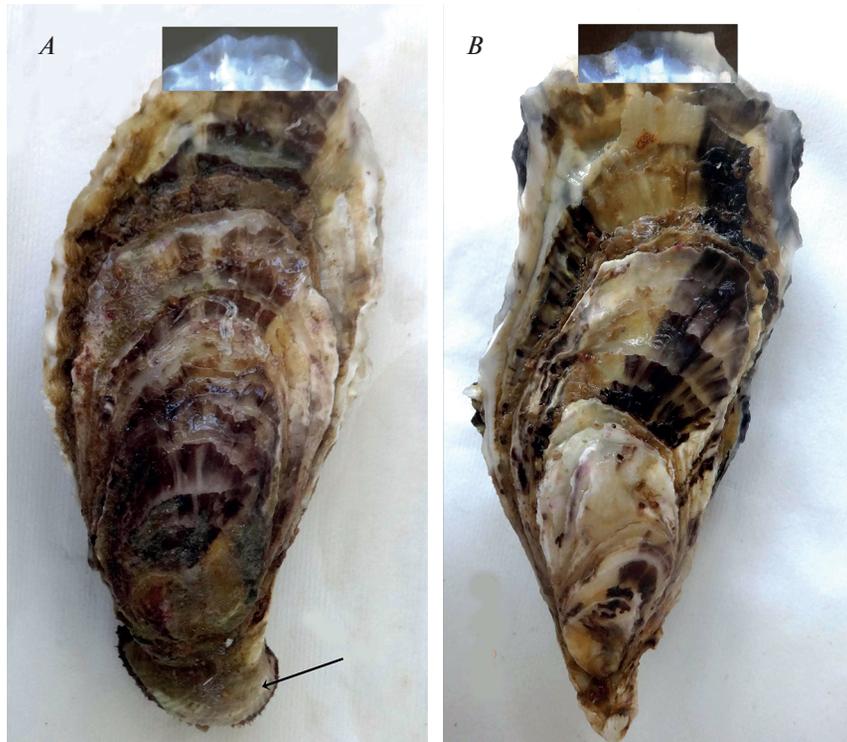


Рис 1. *Crassostrea gigas*: *A* – диплоидная, осевшая из планктона Чёрного моря на раковину анадары *Anadara kagoshimensis* (обозначено стрелкой); *B* – триплоидная, полученная в питомнике атлантического побережья и выращенная до товарного размера на морской ферме Чёрного моря. (Ростовой край устриц выделен полупрозрачным прямоугольником).

триплоидных устриц, а также в левых створках устриц разной плоидности проводили по *t*-критерию Стьюдента (для уровня значимости $P = 0.05$) (Лакин, 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения высоты (H , мм) раковин исследуемых диплоидных и триплоидных устриц примерно равны и составляют соответственно 104.05 ± 19.41 ($SD = 17.15$) и 105.01 ± 25.87 ($SD = 22.86$) мм при более сильном варьировании этого признака у триплоидных устриц (табл. 1). Ширина (D , мм) раковин триплоидных устриц больше (среднее значение 41.24 ± 6.57 мм, $SD = 5.81$), чем диплоидных (среднее значение 30.76 ± 2.67 мм, $SD = 2.36$). И как следствие – значения морфометрических индексов, а особенно выпуклость раковин ($(H + D)/L$) триплоидных устриц больше, чем диплоидных, что является отличительным морфологическим признаком триплоидных устриц с чашевидной раковиной. При сравнении средних значений весовых параметров левых створок диплоидных (26.49 ± 8.88 г, $SD = 7.85$) и триплоидных (26.17 ± 6.08 г, $SD = 7.05$) устриц различия не выявлены (см. табл.1). Однако средний вес правых створок диплоидных устриц несколько больше (20.16 ± 3.98 г, $SD = 3.52$), чем

триплоидных (15.05 ± 5.53 г, $SD = 4.89$). Сравнение веса правых и левых створок диплоидных и триплоидных устриц по критерию Манна–Уитни показало, что различия не достоверны и носят случайный характер: $U_{\text{эмп}} = 14 > U_{\text{кр } 0.05} = 7$.

Органическое вещество в правых створках раковин диплоидных устриц составило: 3.40, 3.17 и 2.99%, у триплоидных – 2.08, 2.01 и 1.87% (табл. 2). После ранжирования полученных данных по величине доли органического вещества и подсчета значения $U_{\text{эмп}}$ установлено, что $U_{\text{эмп}} = U_{\text{кр } 0.05} = 0$ при уровне значимости $p \leq 0.05$. При аналогичном сравнении содержания органического вещества в левых створках диплоидных (4.24, 3.35 и 2.95%) и триплоидных (1.97, 2.12 и 2.35%) устриц также было установлено: $U_{\text{эмп}} = U_{\text{кр } 0.05} = 0$. Так как эмпирическое значение U -критерия равно критическому, то различия в содержании органического вещества как в правых створках диплоидных и триплоидных устриц, так и в левых створках устриц разной плоидности можно считать значимыми.

Для проверки достоверности различий сравнивали средние значения доли органического вещества в правых створках диплоидных (3.19%) и триплоидных (1.99%) устриц по *t*-критерию Стьюдента (для долей). Было установлено, что для уровня значимости $P = 0.05$ и $k = 4$, $t_{\text{ф}} = 7.55 >$

Таблица 1. Весовые и размерные характеристики диплоидных и триплоидных устриц *Crassostrea gigas*

Параметры	Диплоидные устрицы					Триплоидные устрицы				
	1	2	3	сред. знач. $\pm i$	SD	1	2	3	сред. знач. $\pm i$	SD
<i>H</i> , мм	121.06	104.34	86.76	104.05 \pm 19.41	17.15	131.20	94.73	89.09	105.01 \pm 25.87	22.86
<i>L</i> , мм	62.98	77.46	57.40	65.95 \pm 11.72	10.35	53.00	55.36	45.54	51.30 \pm 5.80	5.13
<i>D</i> , мм	32.10	32.15	28.04	30.76 \pm 2.67	2.36	47.00	41.32	35.39	41.24 \pm 6.57	5.81
<i>H/L</i>	1.92	1.35	1.51	–	–	2.48	1.71	1.96	–	–
<i>D/L</i>	0.51	0.42	0.49	–	–	0.89	0.75	0.78	–	–
<i>H + D/L</i>	2.43	1.76	2.00	–	–	3.36	2.46	2.73	–	–
Wп.с., г	24.09	19.09	17.30	20.16 \pm 3.98	3.52	20.22	14.44	10.50	15.05 \pm 5.53	4.89
Wл.с., г	35.12	24.59	19.77	26.49 \pm 8.88	7.85	31.11	23.76	20.65	26.17 \pm 6.08	7.05

Примечания. *H*, мм – высота раковины; *L*, мм – длина раковины; *D*, мм – ширина раковины; *H/L* – сагиттальная кривизна; *D/L* – фронтальная кривизна; (*H + D*)/*L* – выпуклость раковины; Wп.с., г – вес правой створки; Wл.с., г – вес левой створки; сред. знач. – среднее значение; SD – стандартное отклонение; $\pm i$ – 95% доверительные интервалы средних значений.

Таблица 2. Доля (%) неорганического и органического вещества в раковинах диплоидных и триплоидных устриц *Crassostrea gigas*

№ устрицы	Диплоидные устрицы				Триплоидные устрицы			
	правая створка		левая створка		правая створка		левая створка	
	неорг. вещ.	орг. вещ.	неорг. вещ.	орг. вещ.	неорг. вещ.	орг. вещ.	неорг. вещ.	орг. вещ.
1	96.83	3.17	95.76	4.24	97.92	2.08	97.88	2.12
2	96.60	3.40	96.65	3.35	98.13	1.87	98.03	1.97
3	97.01	2.99	97.05	2.95	97.99	2.01	97.65	2.35
Ср. знач. $\pm i$	96.81 \pm 0.23	3.19 \pm 0.23	96.49 \pm 0.75	3.51 \pm 0.75	98.01 \pm 0.12	1.99 \pm 0.12	97.85 \pm 0.22	2.15 \pm 0.22
SD	0.21	0.21	0.66	0.66	0.11	0.11	0.19	0.19

Примечания. неорг. вещ. – неорганическое вещество, орг. вещ. – органическое вещество, сред. знач. – среднее значение, SD – стандартное отклонение, $\pm i$ – 95% доверительные интервалы средних значений.

$> t_{st} = 2.78$. При сравнении средних значений содержания органического вещества в левых створках диплоидных (3.51%) и триплоидных (2.15%) устриц также выявлено достоверное различие: $t_{ф} = 5.03 > t_{st} = 2.78$ ($k = 4$ и $P = 0.05$), т.е. с высокой вероятностью можно утверждать, что доля органического вещества в раковинах диплоидных устриц достоверно выше, чем в раковинах триплоидных.

В результате электронно-микроскопических исследований было показано, что ростовой край раковин диплоидных и триплоидных устриц состоит из двух слоев: периостракума (или конхиолинового слоя) (рис. 2) и призматического слоя (рис. 3). Конхиолиновый слой диплоидных устриц имеет гладкую пористую поверхность (рис. 2А). Вероятно, через поры происходит поступление ионов при минерализации раковины. Периостракум ростового края триплоидных устриц объемный, состоит из соединенных “пластин” разного размера и формы, которые образуют крупные продольные складки и бороздки (рис. 2В). Склад-

ки состоят из нескольких неплотно прилегающих слоев конхиолина. Между складками видны мембраны, покрывающие основание призм.

Призматический слой ростового края диплоидных и триплоидных устриц *C. gigas* расположен непосредственно под периостракумом раковины. Как было показано ранее, призматический слой раковин двустворчатых моллюсков состоит из столбчатых призм в окружении органической оболочки. На рис. 3 представлены электронно-микроскопические фотографии призматического слоя диплоидных *C. gigas*, имеющего характерную “сотовую” структуру. Концы призм представляют собой неправильные многоугольники. Число сторон многоугольных призм – от четырех до шести. Длина сторон отдельных призм правой створки – от 2.27 до 15.53 мкм (рис. 3А–3А1); левой створки – от 5.77 до 18.12 мкм (рис. 3В–3В1). Стороны призм в основном прямые, редко встречаются изогнутые. Толщина межпризматических органических оболочек правой створки от 0.27 до 1.07 мкм, левой створки от 0.44 до 1.15 мкм. Центральная часть большинства призм правой

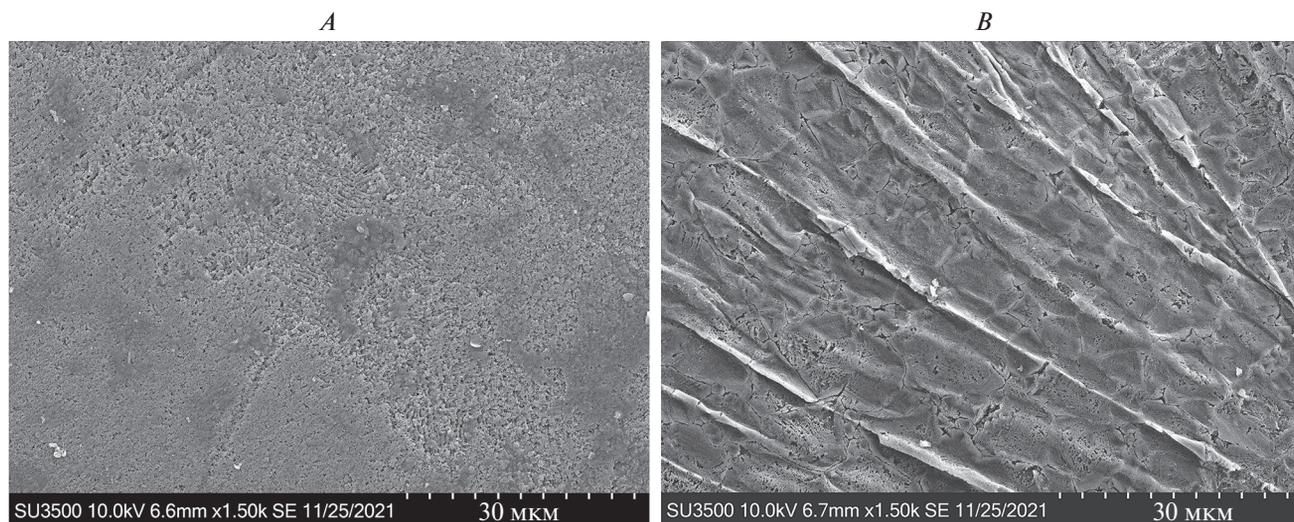


Рис. 2. СЭМ-изображения конхиолинового слоя ростового края правых створках раковин устриц *Crassostrea gigas*: *A* – диплоидной, *B* – триплоидной.

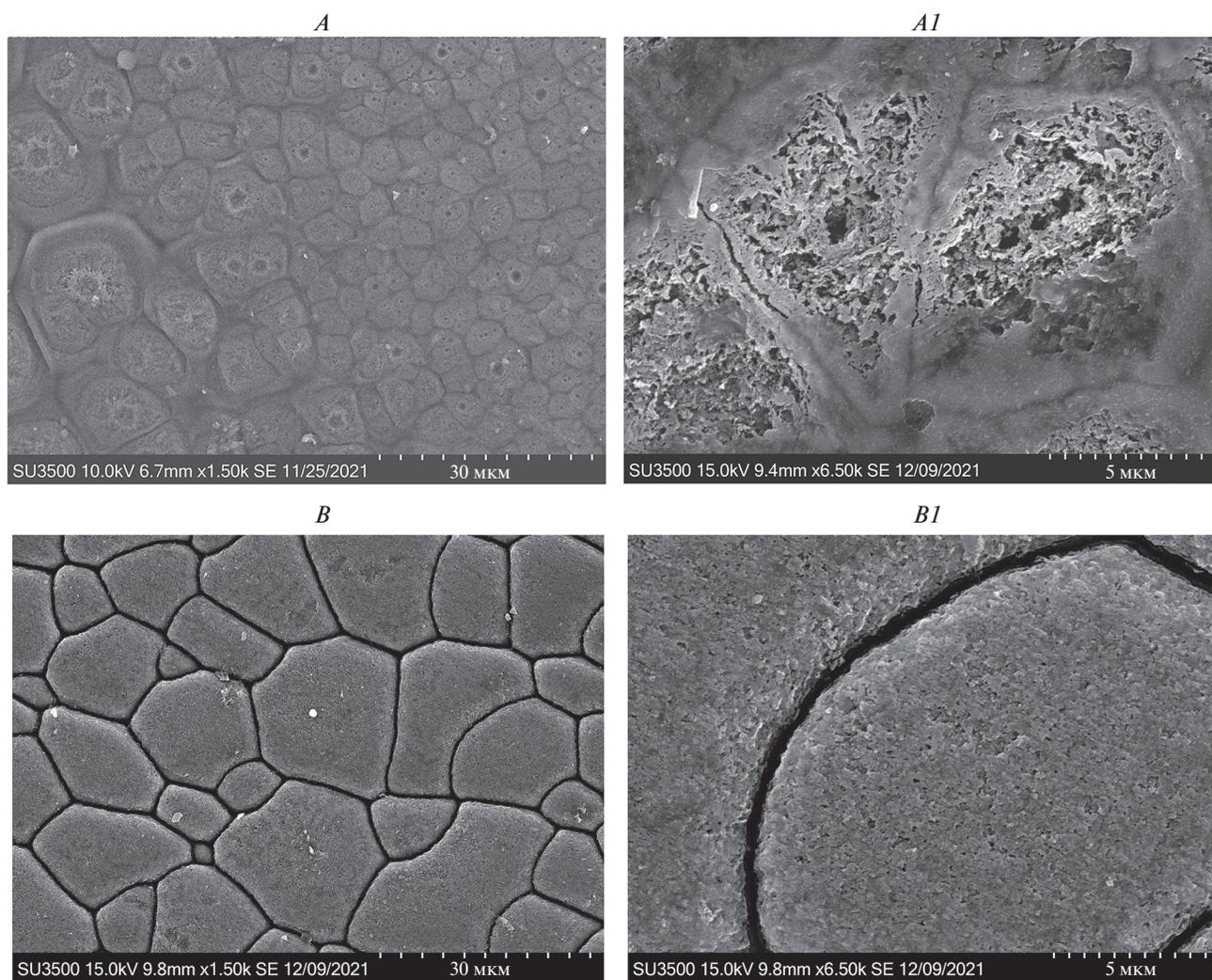


Рис. 3. СЭМ-изображения призматического слоя ростового края раковины диплоидных устриц *Crassostrea gigas*: *A*, *A1* – внутренняя сторона правой створки; *B*, *B1* – внутренняя сторона левой створки.

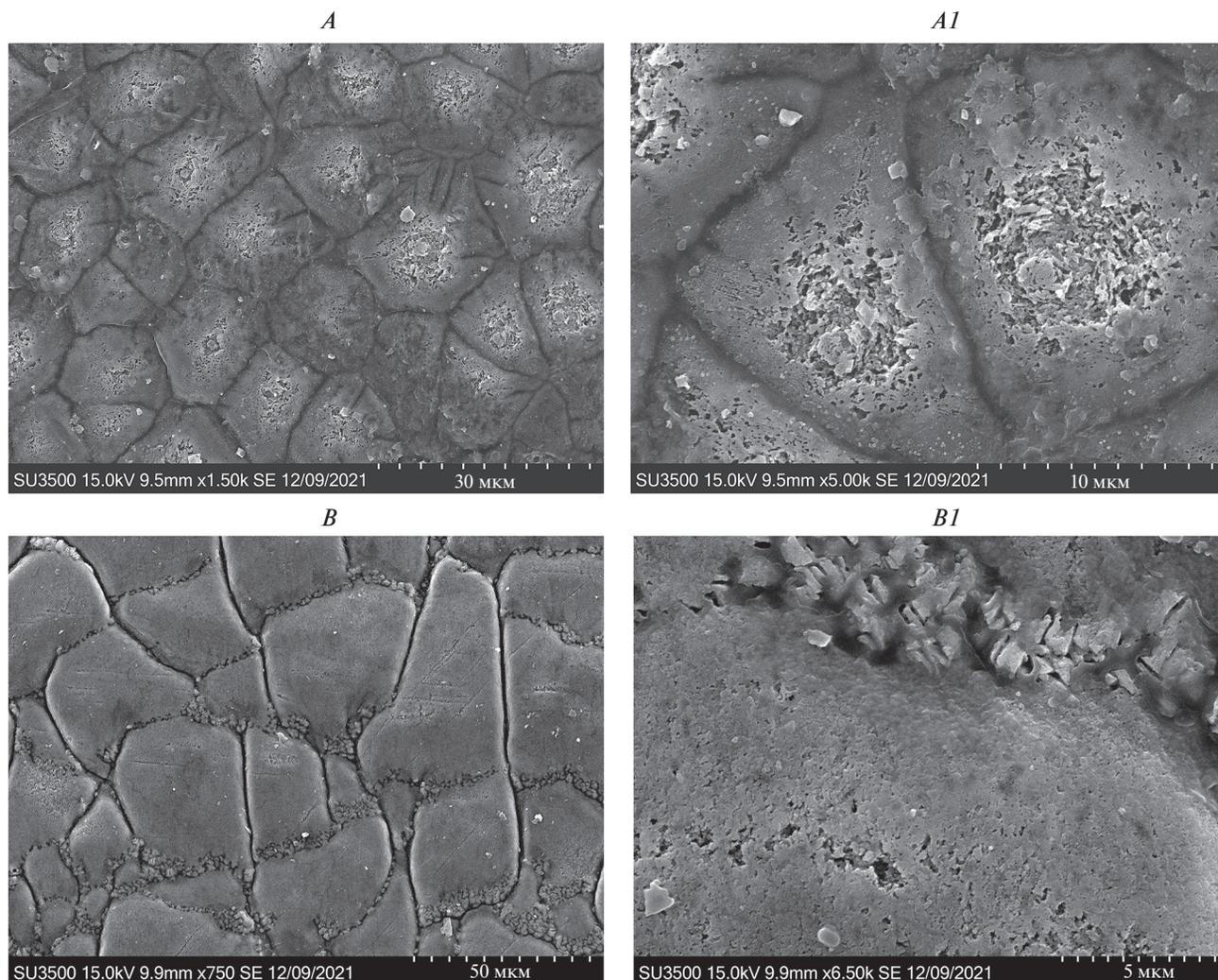


Рис. 4. СЭМ-изображения призматического слоя ростового края раковины триплоидных устриц *Crassostrea gigas*: *A*, *AI* – внутренняя сторона правой створки; *B*, *BI* – внутренняя сторона левой створки.

створки диплоидных устриц не полностью заполнена кристаллами (см. рис. 3*A–3AI*). Вероятно, процесс заполнения идет от внутренних межпризматических стенок к центру призмы. Призмы левой створки полностью заполнены нанокристаллами (см. рис. 3*B*), что очевидно обусловлено разной скоростью обызвествления правой и левой створки.

На рис. 4 представлены электронно-микроскопические фотографии призматического слоя раковин триплоидных *C. gigas*. Число сторон многоугольных призм правой створки от трех до семи; длина сторон от 2.54 до 17.23 мкм (рис. 4*A*). Ширина органической прослойки между призмами от 0.55 до 0.98 мкм. Кроме того, в некоторых призмах органические прослойки врастают в призму примерно на одну треть (до 8.38 мкм). Как и в правой створке диплоидных устриц, центральная часть призм правой створки триплоид-

ных устриц не полностью заполнена кристаллами кальцита (рис. 4*AI*). Углы призм левой створки триплоидных устриц часто округлые; количество сторон от 3 до 5 (рис. 4*B*). Максимальная и минимальная длины сторон различных призм различаются более чем в восемь раз: 5.95 и 43.81 мкм. Кальцитовое заполнение отдельных участков призм значительно ниже нормы (рис. 4*BI*). Ширина органической прослойки от 0.93 до 2.02 мкм. Между многими призмами расположены органические мембраны с частыми включениями округлой формы размерами до 0.94 мкм (см. рис. 4*B–4BI*).

Для уточнения химического состава включений, выявленных в межпризматических органических оболочках призматического слоя левых створок триплоидных устриц, проведено качественное картирование пространственного распределения элементов (кальция, кислорода и углерода) (рис. 5). Выявлено, что в призматическом

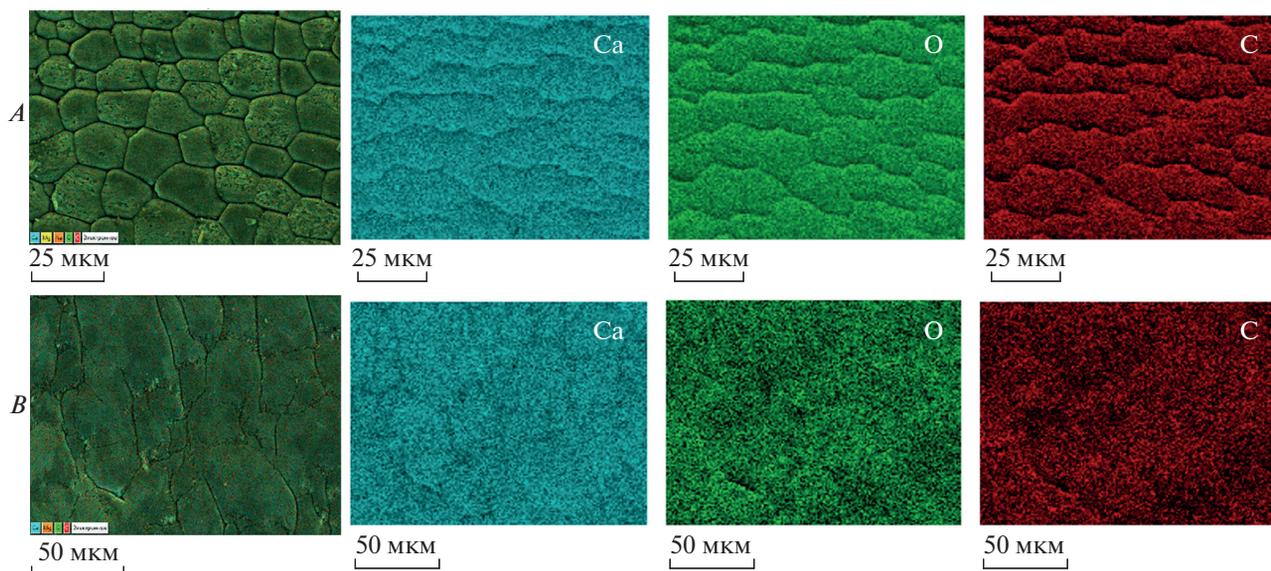


Рис. 5. Карты распределения элементов Ca, C, O в призматическом слое ростового края внутренней стороны левой створки *Crassostrea gigas*: A – диплоидных, B – триплоидных.

слое у диплоидных устриц элементы кальция, кислород и углерод распределены равномерно только в призмах. В межпризматических оболочках эти элементы отсутствуют. Следовательно, призмы состоят из карбоната кальция (CaCO_3). У триплоидных устриц эти элементы распределены равномерно как в призмах, так и в межпризматических оболочках, что свидетельствует о включении CaCO_3 в органический матрикс.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа кариологических препаратов эпителия жабр была подтверждена ploidy исследуемых устриц *C. gigas*. В метафазе митоза гигантских устриц черноморского происхождения – 20 хромосом; на метафазной пластинке устриц атлантического происхождения – 30 хромосом (рис. 6). Ранее были описаны кариотипы диплоидной *C. gigas* с числом хромосом, равным 20 (Ahmed, Sparks, 1967), и кариотипы триплоидной устрицы с числом хромосом, равным 30 (Gerard et al., 1994). Способ получения триплоидных устриц был разработан для применения в аквакультуре. Триплоидные устрицы отличаются от диплоидных более высоким темпом роста, бóльшим весом и более низкой репродуктивной способностью (Payton et al., 2017). Низкая репродуктивная способность триплоидных устриц является следствием нарушения митоза и мейоза на ранних стадиях гаметогенеза (Maillard et al., 2021).

Согласно результатам исследования, содержание органического вещества в раковинах трипло-

идных устриц достоверно ниже, чем в раковинах диплоидных. Так, этот показатель в правых створках триплоидных устриц в 1.6 раза ниже, чем в правых створках диплоидных: 1.99 и 3.19% соответственно. Из литературных источников известно, что органическое вещество в раковинах диплоидных устриц *C. gigas* может составлять от одного (Marie et al., 2011) до двух процентов веса (Seung Woo Lee, Cheong Song Choi, 2007). Вероятно, соотношение органического и неорганического вещества в раковинах гигантской устрицы зависит от места обитания моллюсков, температуры воды и продуктивности акватории.

Ростовой край раковин и диплоидных, и триплоидных устриц состоит из двух слоев: периостракума и призматического слоя. Такая структура раковины характерна для многих двустворчатых моллюсков (Chesa et al., 2005). Толщина межпризматических органических оболочек правой створки диплоидных устриц от 0.27 до 1.07 мкм, левой створки от 0.44 до 1.15 мкм, что в два раза меньше, чем у *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) (Chesa et al., 2005). В раковине диплоидной устрицы призмы левой створки полностью заполнены нанокристаллами, что объясняется разной скоростью обызвествления. Так, согласно данным, полученным при изучении скорости обызвествления раковин молоди *C. virginica*, было установлено, что скорость в левой створке выше, чем правой (Galtsoff, 1964).

В ультраструктуре раковин устриц разной ploidy выявлены существенные различия. Вероятно, это обусловлено разной секреторной активностью эпителиальных клеток периостра-

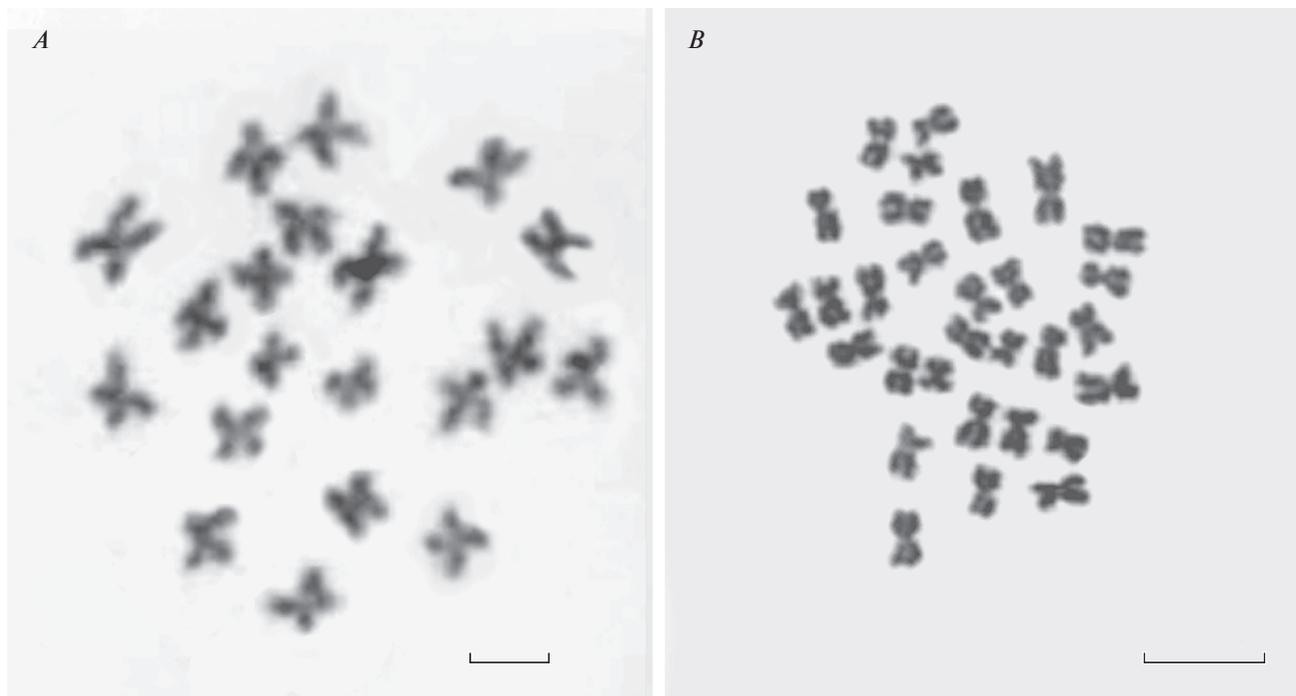


Рис. 6. Метафазы митоза в эпителиальных клетках жабр *Crassostrea gigas*: *A* – диплоидной ($2n = 20$ хромосом), *B* – триплоидной ($3n = 30$ хромосом). Масштаб 10 мкм.

кальной борозды или биологической активностью выделяемого ими секрета. Наличие продольных складок периостракума триплоидных устриц возможно связано с анатомическим строением периостракальной борозды. Согласно данным электронно-микроскопических исследований призматического слоя ростового края раковин устриц, у триплоидных устриц грани призм длиннее, чем у диплоидных; кальцитовое заполнение отдельных участков призм значительно ниже нормы; межпризматические оболочки местами прерывистые с включениями кристаллов карбоната кальция. Вероятно, такие места соответствуют областям края мантии триплоидных устриц с аномально низкой секрецией органического вещества. Или секретируются жидкости – предшественники органических мембран, которые различаются полимеризацией и биохимическим составом. Известно, что биологическую минерализацию контролирует группа кислых белков и гликопротеинов (Weiner, Addadi, 1991). Основными аминокислотами, обнаруженными в матричных белках раковины устрицы *C. gigas*, являются аспарагиновая кислота, сирийн и глицин, причем доля глицина – самая высокая (Almeida et al., 1998). Известно также, что белки, богатые аспарагиновой кислотой, подавляют неконтролируемую кристаллизацию аморфного карбоната кальция во время биоминерализации призматического слоя раковины (Politi et al., 2007). Следовательно, органический матрикс призматического слоя ра-

ковин диплоидных и триплоидных устриц может различаться по качественному или количественному составу белков. У триплоидных устриц было отмечено вращание в призму органических прослоек. Частичное вращение органических оболочек в призматические ячейки характерно также для *O. edulis* (Checa et al., 2005).

Ранее было установлено, что элементный состав раковин *C. gigas* зависит, в основном, от типа отложений и взвешенных частиц, обнаруженных на каждом участке выращивания (Almeida et al., 1998). В нашем исследовании выращивание диплоидных и триплоидных устриц проходило в садках, расположенных близко один к другому. В призматическом слое створок устриц разной плоидности наблюдались разные концентрации элементов, что может быть связано с различающимися механизмами метаболизма диплоидных и триплоидных *C. gigas*, что ранее подтверждено при изучении активности открытия створок устриц. У триплоидных устриц продолжительность открытия створок и их суточный ритм были значительно выше, чем у диплоидных (Payton et al., 2017).

Известно, что у двустворчатых моллюсков концентрация ионов $[Ca^{2+}]$ и $[HCO_3^-]$ контролируется физиологически и изменяется независимо от концентрации этих ионов в окружающей морской воде (Green et al., 2009). Кальций поступает в мантию непосредственно из морской воды и

может поглощаться другими органами моллюска и транспортироваться в мантию. Ионы $[\text{CO}_3^{2-}]$ или $[\text{HCO}_3^-]$ могут либо поглощаться, либо производиться метаболическим путем, причем $[\text{HCO}_3^-]$ является источником неорганического углерода, который используется для кальцификации раковин (Thomsen et al., 2015). Метаболический углерод может составлять до 69% углерода раковин *C. gigas*, и его содержание колеблется в зависимости от скорости метаболизма. У *C. virginica* обнаружена прямая зависимость между активностью пищеварительного тракта и скоростью роста раковины (Galtsoff, 1964).

Из литературных источников известно, что увеличение парциального давления углекислого газа в морской воде и, как следствие, снижение рН в пределах экологически значимого диапазона приводят к снижению степени насыщения воды карбонатом кальция. Это негативно влияет на физиологические процессы, скорость кальцификации и механические свойства раковин устриц *C. gigas* (Dauphina et al., 2013). Экспериментально установлено, что повышенные уровни pCO_2 отрицательно влияют на процесс биоминерализации: изменяются ультраструктура и механические свойства раковин *C. gigas*, увеличивается толщина кальцитовых пластин в гипостракуме и снижается твердость и трещиностойкость раковин (Wei et al., 2015). Значения рН морской воды в месте расположения морской фермы, где проходило выращивание диплоидных и триплоидных устриц, в течение года изменялось в пределах от 8.28 до 8.35 (Karpanov et al., 2020). Такое изменение рН является оптимальным и не могло повлиять на микроструктуру и механические свойства раковин триплоидных устриц.

Поглощение $[\text{Ca}^{2+}]$ и других ионов, необходимых для формирования раковины *C. gigas*, а также условия, влияющие на процесс кальцификации, зависят от солености воды (Sillanpää et al., 2020). Оплодотворение, эмбриональное, личиночное развитие и доращивание диплоидных устриц *C. gigas* до товарного размера проходило в природных условиях Чёрного моря. Сезонные колебания солености воды в Севастопольской бухте, где расположена морская ферма, составили 17.25–18.40‰ (Karpanov et al., 2020). Триплоидные устрицы были получены и выращены до размеров 12 мм в устричном питомнике атлантического побережья при солености воды около 32‰ (Harney et al., 2016). Затем спат триплоидных устриц доращивали до товарного размера на морской ферме Чёрного моря. Известно, что устрицы (особенно из рода *Crassostrea*), как и многие другие эвригалльные организмы, способны жить в морской воде очень широкого диапазона солености (Galtsoff, 1964; Troost, 2010). Гигантские устрицы растут

при оптимальной солености от 20 до 25‰; они также могут встречаться при солености ниже 10‰ и выживают при солености выше 35‰ (Helm et al., 2004). Однако низкая соленость увеличивает стандартную скорость метаболизма *C. gigas* и затраты на кальцификацию раковины, а также приводят к снижению мантийного и жабберного АТФ-уровней и потребления кислорода (Wei et al., 2015). Осморегуляция и транспорт ионов, запасы энергии и метаболизм, а также экспрессия белка и мРНК зависят от солености (Zhao et al., 2012). Влияние солености на транспорт ионов и осморегуляцию представляет особый интерес, поскольку эти функции напрямую связаны с состоянием гемолимфы и, следовательно, процессом кальцификации (Sanders et al., 2018). Хотя физиологические функции устриц, такие как осморегуляция, могут адаптироваться к изменениям солености, в долгосрочной перспективе результирующие изменения переноса ионов могут привести к снижению минерализации раковины. Стресс от воздействия субоптимальной солености может подавлять биоминерализацию, чтобы экономить энергию для осуществления других важных физиологических процессов (Sillanpää et al., 2020).

Таким образом, причиной отличительных особенностей ультраструктуры раковин и низкого содержания органического вещества в створках триплоидных устриц *C. gigas* атлантического происхождения, по сравнению с диплоидными устрицами черноморского происхождения, может быть повышенная скорость метаболизма. Не исключено влияние долгосрочного воздействия резкого снижения солености морской воды на кальцификацию раковин триплоидных устриц при доращивании в Чёрном море до товарного размера.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность директору ООО НИО “Марикультура” В.Д. Шинявскому за предоставленную возможность проведения эксперимента и заведующему лаборатории микроскопии ФИЦ ИнБЮМ В.Н. Лишаеву за оказанную помощь в работе на ЭСМ. Авторы признательны Рецензентам за замечания и ценные советы, которые улучшили содержание рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме: “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” № гос. регистрации 121030300149-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гублер Е.В., Генкин А.А., 1973. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина. Ленинградское отделение. 141 с.
- Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф., 1980. Хромосомы. Методы работы. М.: Атомиздат. 181 с.
- Лакин Г.Ф., 1973. Биометрия. М.: Высшая школа. 342 с.
- Орленко А.Н., 2005. Основные результаты работ по акклиматизации и культивированию гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th.) в Чёрном море за период 1985-2004 гг. // Рыбное хозяйство Украины. Спец. вып. № 6. С. 178–180.
- Пиркова А.В., Ладыгина Л.В., Холодов В.И., 2020. Биологические и биотехнические аспекты организации и функционирования устричного питомника на Чёрном море. Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ. 120 с.
- Раков В.А., 1987. Биология и культивирование устриц // Культивирование тихоокеанских беспозвоночных и водорослей. М.: Агропромиздат. С. 72–84.
- Ahmed M., Sparks A.K., 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*) // Journal of the Fisheries Board of Canada. V. 24. P. 2155–2159.
- Almeida M.J., Machado J., Moura G., Azevedo M., Coimbra J., 1998. Temporal and local variations in biochemical composition of *Crassostrea gigas* shells // Journal of Sea Research. V. 40. № 3–4. P. 233–249.
- Checa A.G., Rodri'guez-Navarro A.B., Esteban-Delgado F.J., 2005. The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves // Biomaterials. V. 26. P. 6404–6414.
- Dauphina Y., Alexander D.B., Castillo-Michel H., Chevalard C., Cuiffa J.-P., Farrea B., Pouvreaux S., Salomé M., 2013. In situ distribution and characterization of the organic content of the oyster shell *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia) // Micron. V. 44. P. 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.09.002>
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018: Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO. 227 p. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
- Galtsoff P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin // Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. Washington. 502 p.
- Gerard A., Naciri Y., Peignon J.-M., Ledu C., Phelipot P., Noiret C., Peudener I., Grizel H., 1994. Image analysis: a new method for estimating triploidy in commercial bivalves // Aquaculture and Fisheries Management. V. 25. P. 697–708.
- Green M.A., Waldbusser G.G., Reilly S.L., Emerson K., O'Donnella S., 2009. Death by dissolution: sediment saturation state as a mortality factor for juvenile bivalves // Limnology and Oceanography. V. 54. № 4. P. 1037–1047.
- Harding J.M., Mann D.R., 2006. Age and growth of wild suminoe (*Crassostrea ariakensis*, Fugita 1913) and Pacific (*C. gigas*, Trunberg 1793) oyster from Laizhou bay, China // Journal of Shellfish Research. V. 25. № 1. P. 73–82.
- Harney E., Artigaud S., Le Souchu P., Miner P., Corporeau Ch., Essid H., Pichereau V., Nunes Flavia L.D., 2016. Non-additive effects of ocean acidification in combination with warming on the larval proteome of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Journal of Proteomics. V. 135. P. 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.001>
- Helm M.M., Bourne N., Lovatelli A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Rome: FAO. 177 p. (FAO Fisheries Technical Paper; № 471).
- Kapranov S.V., Kovrigina N.P., Troshchenko O.A., Rodionova N.Yu., 2020. Long-term variations of thermohaline and hydrochemical characteristics in the mussel farm area in the coastal waters off Sevastopol (Black Sea) in 2001–2018 // Continental Shelf Research. V. 206. P. 1–15. 104185. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2020.104185>
- Kennedy W.J., Taylor J.D., Hall A., 1969. Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy // Biological Reviews. V. 44. P. 499–530.
- Maillard F., Elie N., Villain-Naud N., Lepoittevin M., Martinez A.-S., Lelon C., 2021. Male triploid oysters of *Crassostrea gigas* exhibit defects in mitosis and meiosis during early spermatogenesis // FEBS Open Bio. V. 12. P. 1438–1452. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13356>
- Marie B., Zanella-Cléon I., Guichard N., Becchi M., Marin F., 2011. Novel proteins from the calcifying shell matrix of the pacific oyster *Crassostrea gigas* // Marine Biotechnology. V. 13. P. 1159–1168.
- Marin F., Roy N.L., Marie B., 2012. The formation and mineralization of mollusk shell // Frontiers in Bioscience. V. 4. P. 1099–1125.
- Mouchi V., Lartaud F., Guichard N., Immel F., Rafelis M., Broussar C., Crowley Q.G., Marin F., 2016. Chalky versus foliated: a discriminant immunogold labeling of shell microstructures in the edible oyster *Crassostrea gigas* // Marine Biology. V. 163. № 256. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-3040-6>
- Payton L., Sow M., Massabuau J.-Ch., Ciret P., Tran D., 2017. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas* // PLoS ONE. V. 12. № 10. P. 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185918>
- Pirozzi N.M., Hoogenboom J.P., Giepmans B.N.G., 2018. ColorEM: analytical electron microscopy for element-guided identification and imaging of the building blocks of life // Histochemistry and Cell Biology. V. 150. P. 509–520. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1707-4>
- Politi Y., Mahamid J., Goldberg H., Weiner S., Addadi L., 2007. Asprich mollusk shell protein: in vitro experiments aimed at elucidating function in CaCO₃ crystallization // CrystEngComm. № 12. P. 1171–1177 (abstract).

- Sanders T., Schmittmann L., Nascimento-Schulze J.C., Melzner F., 2018. High Calcification Costs Limit Mussel Growth at Low Salinity // *Frontiers in Marine Science*. V. 5 Article 352.
https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00352
- Seung Woo Lee, Cheong Song Choi, 2007. The correlation between organic matrices and biominerals (myostracal prism and folia) of the adult oyster shell, *Crassostrea gigas* // *Micron*. V. 38. P. 58–64.
- Sillanpää J.K., Reis Cardoso J.C., Félix R.C., Anjos L., Power D.M., Sundell K., 2020. Dilution of Seawater Affects the Ca²⁺ Transport in the Outer Mantle Epithelium of *Crassostrea gigas* // *Frontiers in Physiology*, 22 January 2020.
https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00001
- Soisuwan S., Phommachant J., Wisajorn W., Praserttham P., 2014. The characteristics of green calcium oxide derived from aquatic materials. *Procedia Chem*. V. 9. P. 53–61.
https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.05.007
- Song X., Liu Z., Wang L., Song L., 2019. Recent Advances of Shell Matrix Proteins and Cellular Orchestration in Marine Molluscan Shell Biomineralization // *Marine Science*. Article 4. V. 6.
https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00041
- Suzuki M., Kogure T., Nagasawa H., 2017. Studies on the Chemical Structures of Organic Matrices and Their Functions in the Biomineralization Processes of Molluscan Shells // *A Gri-Bioscience Monographs*. V. 7. № 2. P. 25–39.
- Thomsen J., Haynert K., Wegner K.M., Melzner F., 2015. Impact of seawater carbonate chemistry on the calcification of marine bivalves // *Biogeosciences*. V. 12. № 14. P. 4209–4220.
https://doi.org/10.5194/bg-12-4209-2015
- Troost K., 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries // *Journal of Sea Research*. V. 64. № 3. P. 145–165.
https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.02.004
- Waite J.H., Saleuddin A.S.M., Andersen S.O., 1979. Periostracin – A Soluble Precursor of Sclerotized Periostracum in *Mytilus edulis* L. // *Journal of Comparative Physiology*. V. 130. P. 301–307.
- Waller T.R., 1980. SEM of the shell and mantle in the order Arcoida (Mollusca, Bivalvia) // *Smithsonian Contributions to Zoology*. V. 313. P. 1–58.
- Wei L., Wang Q., Wu H., Ji C., Zhao J., 2015. Proteomic and metabolomics responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to elevated pCO₂ exposure // *Journal of Proteomics*. V. 112. P. 83–94.
https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.010
- Weiner S., Addadi L., 1991. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controls of crystal formation // *Trends Biochem. Science*. V. 16. P. 252–257.
- Zhao X., Yu H., Kong L., Li Q., 2012. Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* // *PLoS ONE*. V. 7. № 9: e46244.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046244

FINE STRUCTURE OF THE SHELL OF DIPLOID AND TRIPLOID OYSTERS, *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG 1793) (BIVALVIA, OSTREIDAE) REARED IN THE BLACK SEA

A. V. Pirkova^{1, *}, L. V. Ladygina^{1, **}

¹Kovalevsky Institute of the Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences,
2 Nakhimov av., Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: avpirkova@mail.ru

**e-mail: lvladygina@yandex.ru

The fine structure and chemical composition of the shell growth margin were compared in diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), reared to commercial size in a Crimean marine farm. The diploid oysters were deposited from plankton, whereas the triploid ones were obtained from an Atlantic coast nursery. An electron scanning microscope SEM Hitachi U 3500 with built-in software Oxford Ultin Max 65 for microanalysis was employed in the study. The shell growth margin is shown to consist of two layers: periostracum and prismatic. The periostracum in diploid oysters is smooth and porous, whereas the periostracum of triploid oysters is volumetric and shows longitudinal folds. The prismatic layer of both right and left shell valves consists of prisms surrounded by organic membranes. In contrast to diploid oysters, triploid ones have longer prism facets, their calcite filling is significantly lower than normal, their interprismatic organic membranes are discontinuous and contain calcium carbonate. The proportion of organic matter in diploid oyster shells is significantly higher than that in triploid ones. The factors affecting the fine structure of oyster shells differing in ploidy are discussed.

Keywords: shell growth margin, fine morphology, ploidy, chemical composition