

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК: 639.51

ИЗУЧЕНИЕ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА КРЕВЕТКИ ТРАВЯНОЙ
(*PALAEEMON ADSPERSUS* RATHKE, 1837)

Зинабадинова С.С., Кулиш А.В., Сухаренко Е.В.

ФГБОУ ВО «Керченский морской технологический университет»,

г. Керчь, Российская Федерация,

e-mail: sabrieshka@yandex.ru, kulish1972@mail.ua, helenasuhar@gmail.com

Исследованы стадии эмбрионального развития наиболее многочисленного и единственного промыслового вида из 43 видов десятиногих ракообразных Азово-Черноморского бассейна – креветки травяной *Palaemon adspersus* Rathke, 1837. Пробу отбирали в юго-западной части акватории Керченского пролива на прибрежном участке с песчано-илистым грунтом с *Zostera* sp. Описаны четыреста стадии эмбрионального развития *P. adspersus*. В ходе изучения стадий развития – нерестовое яйцо, зародышевый диск, формирование глазного примордия, эмбриональный науплий – определены качественные признаки раннего и позднего эмбриогенеза. Установлены эмбриологические маркеры ранних этапов развития – расширение перивителлинового пространства, дифференциация полюсов яйца (формирование зародышевого диска). Выявлено, что на более поздних стадиях развития наиболее информативными являются этапы формирования науплиарных зачатков (антенн, антенул, мандибул), глазных примордиев (форма пигментного слоя сетчатки, детерминация роговицы), а также метамеризация отделов тела, соотношение неутилизованного зародышем желтка и объема яйца, дифференциация тельсона. **Ключевые слова:** эмбриогенез, маркеры эмбрионального развития, десятиногие ракообразные, *Palaemon adspersus*.

Введение

Креветки рода *Palaemon* Weber, 1795 относятся к наиболее значимой группе десятиногих ракообразных Азово-Черноморского бассейна. В Черном море этот род гидробионтов представлен пятью видами (*P. adspersus* Rathke, 1837; *P. elegans* Rathke, 1837; *P. longirostris*, Н. Milne Edwards, 1837; *P. macrodactylus* Rathbun, 1902; *P. serratus* (Pennant, 1777)). Из них три вида являются аборигенными (*P. adspersus*; *P. elegans*; *P. serratus*), а два (*P. longirostris*; *P. macrodactylus*) вселились в бассейн в начале XXI столетия. Единственным промысловым объектом не только из представленных видов, но и всех 43 видов десятиногих ракообразных, обитающих в Азовском и Черном морях (Anosov, 2012), является креветка травяная *Palaemon adspersus*. Таксономически травяная креветка *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) относится к типу членистоногих Arthropoda, классу высших раков Malacostraca, отряду десятиногих раков Decapoda, инфраотряду настоящих креветок Caridea, семейству Palaemonidae и роду *Palaemon*.

Для биологии развития промысловых беспозвоночных исследование эмбриогенеза особенно актуально. Данные по эмбриональному развитию позволят более точно оценить динамику популяции ценных видов десятиногих ракообразных. Особенно значимо, что типы яйцевых клеток и способы дробления у таких гидробионтов весьма многообразны. При этом закономерности, связывающие план строения ракообразных с типом дробления или способом гастрюляции исследованы недостаточно.

В последние годы интерес к изучению процессов эмбриогенеза усилился (Kalinina, 2015; Day и др., 2016; Hertlez и др., 2018; Kelly и др., 2018; Lopez-Cuados и др.,

2018; Alves и др., 2019; Ituarte и др., 2019). Особенно активно исследуется природа генетических программ развития, молекулярно-биологических механизмов, лежащих в основе морфогенетических процессов эмбрионального развития (Hertlez и др., 2018; Lopez-Cuados и др., 2018). Заслуживают особого внимания работы, посвященные изучению эмбриональной смертности у ракообразных (Kalinina, 2015) и влиянию различных химических соединений на продолжительность эмбриогенеза (Ituarte и др., 2019).

Развивающиеся эмбрионы большинства видов ракообразных расположены во внешней «выводковой камере», образованной плеоподами. Такая особенность развития делает их удобным объектом для исследования, позволяя систематически отслеживать морфологические детерминационные процессы в эмбриогенезе. В научной литературе встречается различное описание стадий эмбриогенеза ракообразных. В работе Pinheiro, Nattori, 2002 выделение трех периодов развития (начального, среднего и позднего этапов развития) на примере *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) происходит на основе размеров яиц. При наличии общего описания морфологических структур зародыша в качестве эмбриологических маркеров, дифференцирующих этапы онтогенеза, были выбраны различия в длине большого и малого диаметров яиц, а разделение этих этапов на 8 стадий развития, определялось в зависимости от соотношения объема эмбриона и объема желтка на разных стадиях. Однако объем яиц существенно зависит от поглощения воды яйцевыми оболочками, поэтому выбор такой характеристики в качестве основного эмбриологического маркера является спорным. Такая особенность функционирования яйцевых оболочек эмбрионов ракообразных подтверждается также и данными других исследований (Wear, 2010).

В других работах по эмбриогенезу ракообразных в качестве эмбриологических маркеров предлагается использовать начало пигментации глазного зачатка или формирование оптических долей. В частности, формирование глаза на 3 стадии эмбриогенеза (Arrobas, 1983); выраженную пигментацию глаз на 7 стадии при общем количестве стадий эмбриогенеза равном 9 (Müller, Ammar, Nazari, 2004); формирование зачатка глаза на 2 стадии при выделении 8 стадий эмбриогенеза (Giestada Silva, 2006), формирование глаза на 3 стадии из 5 стадий эмбриогенеза (Буруковский, 1992). Такие существенные различия в схематизации процессов эмбриогенеза объясняются описанием в работах различных таксономических единиц ракообразных, различным типом яйцеклеток (центролецитальных, олиголецитальных) откладываемых самками. Например, авторы работ Alves и др, 2019 описали 9 стадий эмбриогенеза, однако указали, что такое разделение связано с тем, что исследуемый вид *Lysmata vittata* (Stimpson, 1860) (Crustacea, Caridea, Lysmatidae) является паразитом и имеет соответствующие особенности развития, например, укороченный период эмбриогенеза, полное втягивание желтка у вылупившейся личинки. Поэтому при описании и разделении стадий развития важно не только выбрать четко выраженный эмбриологический маркер, характеризующий стадию (например, пигментация глаз), но и детализировать морфологические описания. Такие данные позволят сравнивать схемы развития у различных видов, будут способствовать систематизации данных по эмбриогенезу.

Как упоминалось выше, эмбрионы высших ракообразных развиваются экстернально: от родительского организма – в «выводковой камере». На этот процесс существенное влияние оказывают экологические факторы (сезонные, географические флуктуации, изменения температуры и солености и т.д.). Соответственно, одновременно с составлением шкалы эмбриологических стадий в исследованиях необходимо обратить особое внимание на морфологические признаки патологических изменений в развитии зародышей. Подробное морфологическое описание эмбриогенеза *P. Adspersus* позволит систематизировать имеющиеся данные по эмбриогенезу, а полученные результаты по

детерминации постэмбриональных структур и органов в периоде эмбриогенеза помогут детальнее понять особенности их функционирования.

Цель исследования – охарактеризовать стадии эмбрионального развития *P. adspersus*, выделив качественные признаки для их дифференциации.

Материалы и методы

В качестве материала для проведения исследования использовали особи креветок, *P. adspersus*, отобранные в юго-западной части акватории Керченского пролива (июнь, 2019 г.). Сбор материала осуществлялся на прибрежном участке верхней сублиторали с глубинами от 0 до 2-х метров ($45^{\circ}08'04.61''N$ $36^{\circ}25'21.38''E$) с песчано-илистым грунтом с зостерой (*Zostera* sp.). Отлов креветок проводили с помощью гидробиологического сачка с входным отверстием 60x40 см и ячейей 1 мм. Из улова отбирались только самки *P. adspersus*, имеющие на плеоподах развивающиеся яйца (50 особей). Видовая принадлежность креветок определялась по общепринятым диагностическим ключам (по Кобякова, Долгопольская, 1969). На месте лова материал фиксировался в 4%-ом растворе формальдегида.

В лабораторных условиях у каждой самки *P. adspersus* с абдомена и брюшных ножек (плеопод) пинцетом снималась вся кладка яиц. Яйца размещались в камере Богорова и просматривались под увеличением x4, x8, x8,4 и x9 (при помощи бинокулярного стереомикроскопа SZM-45T2 и web-камеры DCM-130).

Результаты и их обсуждение

По результатам исследования в эмбриогенезе *P. adspersus* выделено четыре стадии: нерестовое яйцо, зародышевый диск, начало формирования глазного примордия, эмбриональный науплий.

Стадия 1. Нерестовое яйцо – морфологические признаки дробления отсутствуют. Форма яиц сферическая, визуальных отличий по форме яиц не наблюдается. Отчетливо видны нити прикрепления. Замершие зародыши или пустые яйцевые оболочки встречаются редко (0–1 на 100 шт). Перивителлиновое пространство выражено незначительно. Желток имеет ярко-желтую окраску, крупногранулированный, гранулы гомогенны – одинаковой формы и размеров (рис. 1).

Отмеченное единообразие формы яиц, гомогенная грануляция желтка, отсутствие гетерохромности в окраске его содержимого являются важнейшими признаками, которые могут быть выбраны в качестве маркеров эмбрионального развития на ранних стадиях онтогенеза. Такие маркеры позволяют четко различать патологические измененных зародышей и эмбрионов с нормальным развитием. Следует отметить, что уже на первой стадии развития присутствуют особи с выраженными патологическими признаками (искривление формы яиц, окрашивание желтка в разные оттенки в разных яйцах, гетерохромия гранул внутри одного яйца). Для таких особей наблюдалось около 2–5 замерших зародышей (или пустых яйцевых оболочек) на каждые 100 яиц. Полученные результаты согласуются с данными о явлении гетерохронности процессов эмбриогенеза ракообразных вызванные различием в снабжении кислородом внешних и внутренних доменов зародышей «выводковой камеры» (Fernandez, Ruiz-Tagle, Cifuentes, Arntz, 2003). Однако следует учитывать, что этология инстинкта заботы о потомстве у самок *P. adspersus* предполагает постоянное и активное совершение определенных паттернов движения брюшными ногами для равномерного снабжения всех уровней камеры кислородом, удаления замерших зародышей и т.д.

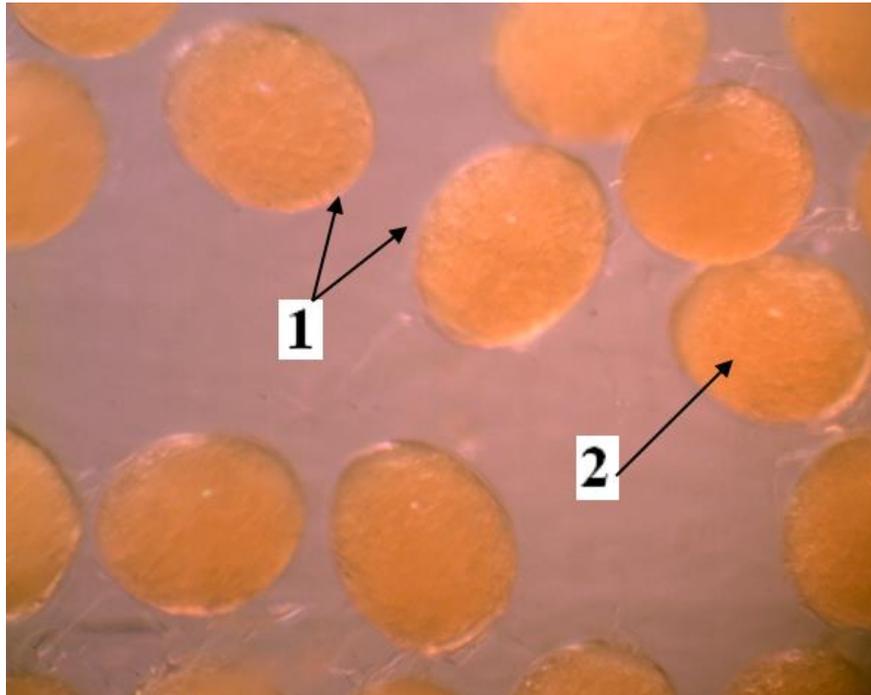


Рис. 1. Яйца *P. adpersus* на первой стадии развития: 1 – места соединения хориона и яйцевых оболочек (в дальнейшем реорганизуются в перивителлиновое пространство), 2 – гранулы желтка. Об. х 2, ок. х 2

Кроме того, установлено, что прикрепляющие нити достаточно прочные и имеют значительную длину, что повышает потенциальную мобильность яиц и способствует лучшей оксигенации зародышей (рис. 2).

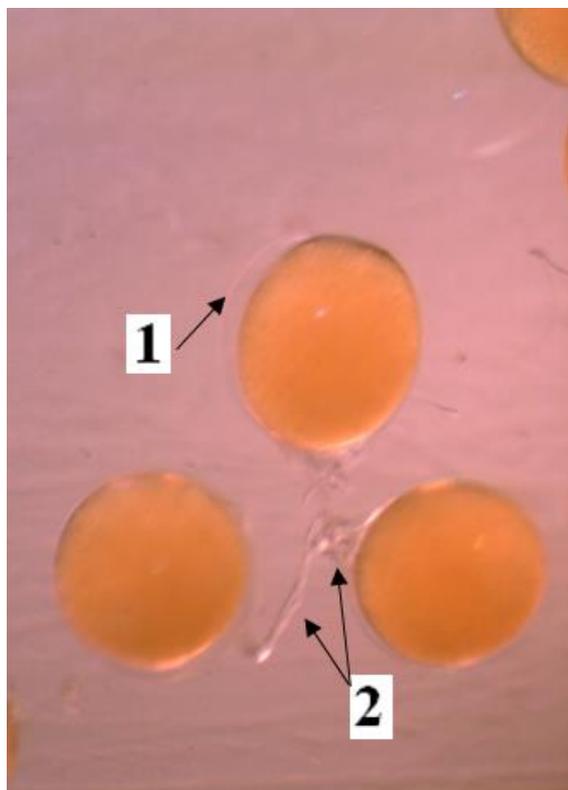


Рис. 2. Яйца *P. adpersus* на второй стадии развития: 1 – перивителлиновое пространство; 2 – прикрепляющие нити, удерживающие в «связке» три яйца. Об. х 2, ок. х 2

Стадия 2. Зародышевый диск – форма яиц сферическая, визуальных отличий по форме яиц не наблюдается. Нити прикрепления видны отчетливо. Замерших зародышей или пустых яйцевых оболочек не наблюдается. Окраска желтка визуальна (даже без использования увеличительных приборов) на тон темнее, чем на предыдущей стадии. Его гранулы значительно меньше, однако их гомогенность по размерам и форме сохраняется. Такие изменения в желтке на наш взгляд свидетельствуют о ферментативной обработке содержимого желточных гранул для последующего их включения в метаболизм формирующихся клеток зародыша.

На данной стадии отчетливо прослеживается увеличение перивителлинового пространства в сравнении с развитием перивителлинового пространства на предыдущей стадии. Такие изменения предположительно объясняются усилением диффузии воды через яйцевые оболочки для осуществления процессов гидролитического ферментативного расщепления содержимого желточных гранул.

Среди морфологических изменений отмечено, что в яйцах на данной стадии развития четко различим анимальный полюс с зародышевым диском и вегетативный полюс с желтком (рис. 3). На анимальном полюсе по краям зародышевого диска наблюдается формирование валиков из клеток: клетки, образующие ранние зародышевые структуры бесцветны и поэтому хорошо различимы на фоне желтка даже при отсутствии специфичного окрашивания. Такая особенность делает возможным проведение витальных исследований.

Стадия 3. Начало формирования глазного примордия – форма яиц овальная, визуальных отличий по форме яиц не наблюдается. Отчетливо видны нити прикрепления. Встречаются замершие зародыши и пустые яйцевые оболочки (не более 1 на 100 яиц). Желток мелкозернистый, гранулы гомогенные, цвет желтка такой же, как и на предыдущей стадии, однако его количество значительно меньше – около половины от объема яйца.

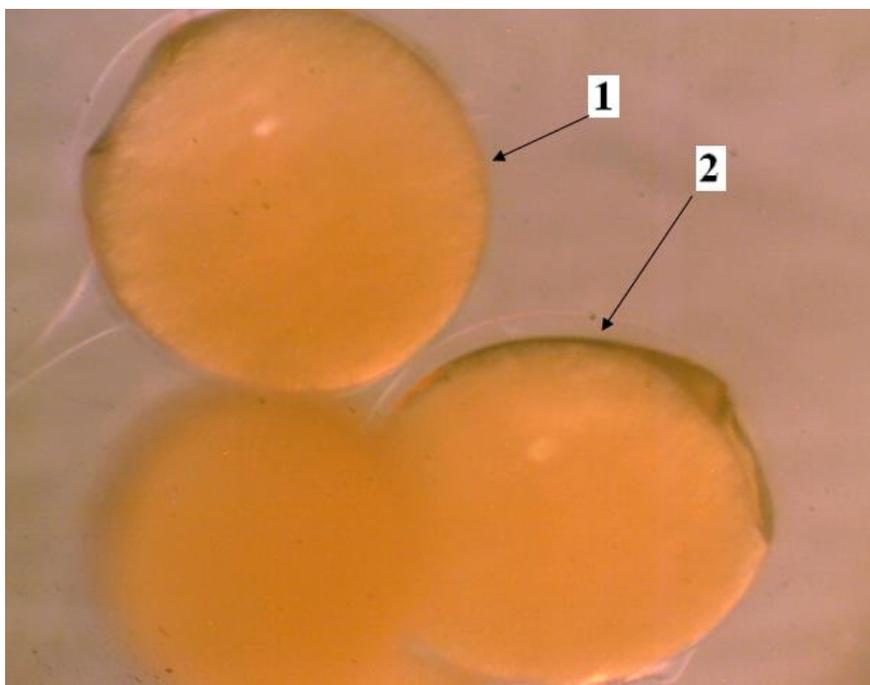


Рис. 3. Яйца *P. adspersus* на второй стадии развития: 1 – вегетативный полюс с желтком, 2 – анимальный полюс с зародышевым диском. Об. х 2, ок. х 4

Форма зародыша С-образная, основная часть желтка сосредоточена в районе формирующегося карапакса, который на данной стадии развития не является монолитной структурой, образующей головогрудной щит (рис. 4).

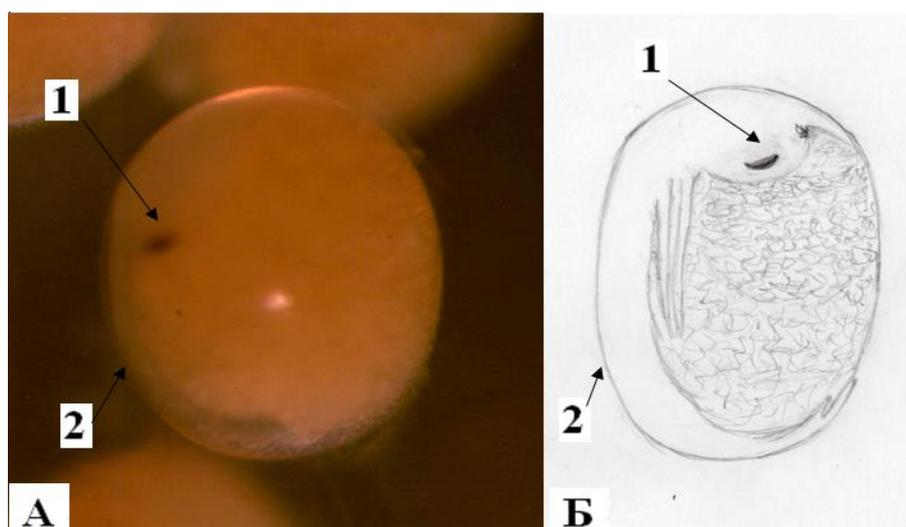


Рис. 4. Яйцо *P. adpersus* на третьей стадии развития: А – фотография зародыша. Об. х 2, ок. х 4,2. Б – схематический рисунок стадии. 1 – область формирующихся оптических долей (верифицируется по зрительным пигментам сетчатки), 2 – С-образно изогнутый зародыш

Важно отметить, что в выделенной, по результатам исследования, третьей стадии развития отмечены значительные морфологические изменения с указанием отчетливо различимых границ эмбриональных структур:

- в краниальной области наиболее выраженными эмбриональными маркерами стадии стоит считать зачаток глаза (который формируется в виде парных тонких изогнутых удлиненных полос), который обозначает зону оптических долей, а также формирующийся массивный рострум;
- в медиальной латеральной области зародыша детерминируются зачатки трех пар науплиарных придатков – антенн, антенулл и мандибул;
- в каудальной области отмечается дифференциация хвостового сосочка на зачатки тельсона и уropод (рис. 5).

Следует обратить особое внимание, что у глазных зачатков наблюдается закладка парных пигментных структур из скоплений нескольких ярко окрашенных в красный цвет крупных клеток. Выявленные образования предположительно являются зачатками хроматофоров у эмбрионов креветки *P. adpersus*. Известно, что в толще покровов многих десятиногих (в том числе и креветок *Palaemon*) расположены многочисленные, снабженные длинными разветвленными отростками органы, называемые хроматофорами и содержащие огромное количество зерен пигмента. Все типы окраски взрослых особей определяются присутствием в покровах пигментов, большая часть которых представлена каротиноидами. Особенно обычен из них астаксантин, в чистом виде имеющий красный цвет. Соединяясь с белками он образует пигменты синеватых и буроватых тонов. В эмбриональном развитии на начальных стадиях формирования хроматофоров мы наблюдаем пигментацию клеток именно в красный цвет.

Известно (Мамонов, 2006), что к хроматофорам не подходят нервы. Их деятельностью управляют органы внутренней секреции, находящиеся главным образом в глазном стебельке. Световое раздражение, воспринимаемое глазами, передается этим органам, а они выделяют в кровь различные гормоны. Одни гормоны заставляют зерна того или иного пигмента распространяться по отросткам хроматофора, другие, наоборот, вызывают их концентрацию. Такой механизм работы хроматофор подтверждается нашими эмбриологическими исследованиями: закладка хроматофор наблюдается в оптической доле, далее наблюдается распространение одиночных пигментированных по телу зародыша.

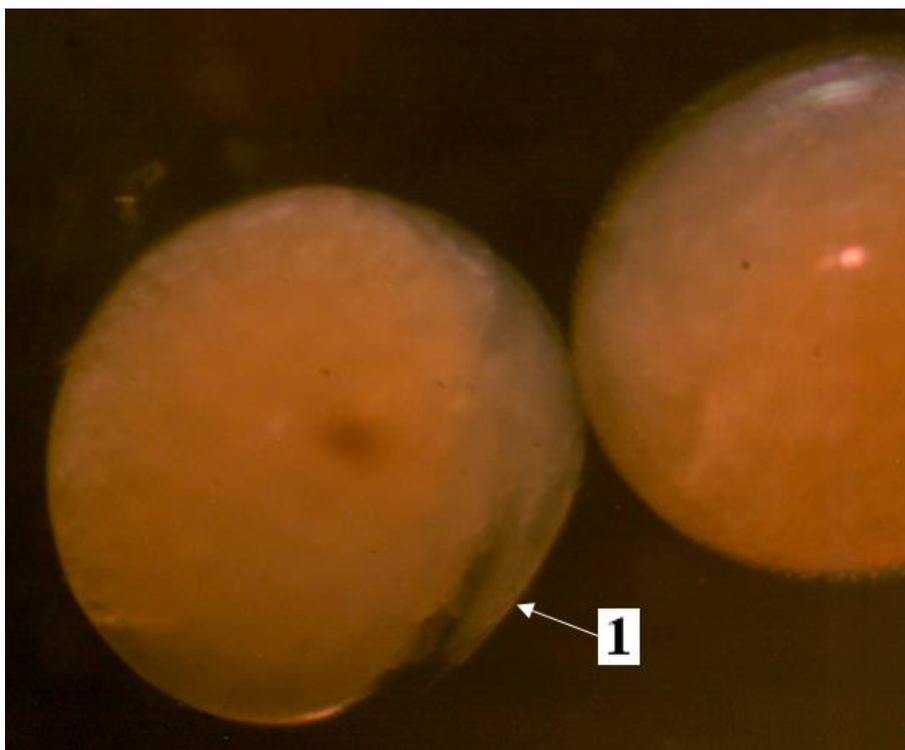


Рис. 5. Яйца *P. adspersus* на третьей стадии развития: 1 – каудальная часть зародыша с формирующимся тельсоном. Об. х 2, ок. х 4,5

Стадия 4. Эмбриональный науплиус – форма яиц овальная, визуальных отличий по форме яиц не наблюдается. Отчетливо видны нити прикрепления. Встречаются замершие зародыши и пустые яйцевые оболочки (не более 1 на 100 яиц). Количество желтка меньше, чем на предыдущей стадии. Оптические доли овальные, наблюдается разделение на роговицу и сетчатку; зона зрительных пигментов – округлая, рострум массивный (рис. 6).

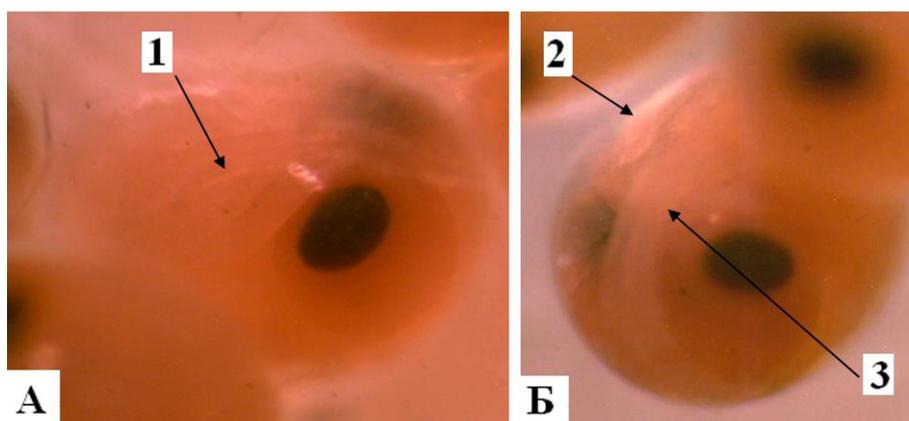


Рис. 6. Яйца *P. adspersus* на четвертой стадии развития: А – фотография с латеральной стороны зародыша, Об. х 2, ок. х 4,5, Б – фотография с краниальной стороны зародыша, Об. х 2, ок. х 4,2. 1 – формирование конечностей абдомена и брюшного отделов, 2 – формирующийся тельсон, 3 – формирующийся рострум

Сегментация конечностей в абдомене выражена отчетливо, начало сегментации в брюшном отделе. В каудальной части зародыша тельсон из-за выраженного изгиба эмбриона частично перекрывает глазные доли.

Заключение

Анализ стадий эмбриогенеза *P. adspersus* (нерестовое яйцо, зародышевый диск, формирование глазного примордия, эмбриональный науплий) позволяет предложить в качестве маркеров раннего этапа развития – расширение перивителлинового пространства, дифференциацию полюсов яйца (формирование зародышевого диска). В качестве диагностического признака патологического развития могут быть использованы гетерогенность желточных гранул по размерам и окраске.

Среди эмбриологических маркеров на более поздних стадиях развития наиболее информативными являются формирование науплиарных зачатков (антенн, антенул, мандибул); формирование глазных примордиев (форма пигментного слоя сетчатки, детерминация роговицы), а также метамеризация отделов тела, соотношение неутилизованного зародышем желтка и объема яйца, дифференциация тельсона.

Дальнейшая детализация шкалы эмбриогенеза *P. adspersus* позволит выделить критические периоды на ранних стадиях развития и оценить структуру желточной организации, что имеет особое значение, поскольку доступность питательных элементов желтка влияет на степень пролиферации и дифференциации клеток и структур зародыша. На более поздних стадиях развития критические периоды могут быть обусловлены закладкой сложных эмбриональных структур, которые начинают приобретать черты будущей функциональности.

Список литературы

1. Буруковский Р.Н. Методика биологического анализа некоторых тропических и субтропических креветок // Промыслово-биологические исследования морских беспозвоночных. – М.: ВНИРО, 1992. – С. 77–84.
2. Кобякова З.И., Долгопольская М.А. Отряд десятиногих – Decapoda // Определитель фауны Черного и Азовского морей. Том 2. – Киев: Наукова думка, 1969. – С. 270–306.
3. Мамонов Г. Пресноводные креветки // Биология. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://bio.1sept.ru/view_article.php?ID=200602001 (дата обращения 10.10.2019 г.).
4. Alves D.F.R, Lopez G.L.S, Barros-Alves S.P, Hirose G.L. Sexual system, reproductive cycle and embryonic development of the red-striped shrimp *Lysmata vittata*, an invader in the western Atlantic Ocean // PLoS One. – 2019. – V. 14 (1). – pp. 102–109
5. Anosov S.E., Spiridonov V.A., Marin I.N. A revised check-list of the Black Sea // Decapoda. – Athens: Greece, 2012. – P. 124.
6. Day R.D, McCauley R.D, Fitzgibbon Q.P, Semmens J.M. Seismic air gun exposure during early-stage embryonic development does not negatively affect spiny lobster *Jasus edwardsii* larvae (Decapoda: Palinuridae) // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – pp. 124–137.
7. Fernandez N. M, Ruiz-Tagle S, Cifuentes H, Pörtner O, Arntz W. Oxygen-dependent asynchrony of embryonic development in embryo masses of brachyuran crabs // Marine Biology. – 2003. – V. 142 (3). – pp. 559–565.
8. Garcia-Guerrero M, Hendrickx M.E. Embryology of Decapod Crustaceans I. Embryonic Development of the Mangrove Crabs *Goniopsis Pulchra* and *Aratus Pisonii* (Decapoda: Brachyura) // Journal of Crustacean Biology. – 2004. – V. 24 (4). – pp. 666–672.
9. Giesta da Silva T.F. Fecundity, Embryonic Development and Mercury Contamination of the *Palaemon serratus* at North Coast of Portugal // IX forum of resources mariños and the acuicultura of the galician rías. – October 2006
10. Hertzler P.L, Wei J, Droste A.P, Yuan J, Xiang J. Penaeid shrimp brachyury: sequence analysis and expression during gastrulation // Dev Genes Evol. – 2018. – V. 228 (5) . – pp. 125–201.

11. Ituarte R.B, Vazquez M.G, Bas C.C. Chemically induced plasticity in early life history of *Palaemon argentinus*: are chemical alarm cues conserved within palaemonid shrimps? // J Exp Biol. – 2019. – V. 222 (Pt 13). – pp. 223–226.
12. Kalinina M.V. Fertility and Embryonic Mortality Level of the Japanese Mitten Crab *Eriocheir japonica* (Crustacea: Decapoda: Varunidae) in Primorye // Ontogenez. – 2015. – V. 46 (6). – pp. 393–401.
13. Kelly K.L, Taylor C.M. Effects of crude oil on survival and development in embryonated eggs in *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda, Portunidae) // PeerJ. – 2018. – V. 6. – pp. 123–146.
14. Lopez-Cuadros I, Garcia-Gasca A, Gomez-Anduro G, Escobedo-Fregoso C, Llera-Herrera R.A, Ibarra A.M. Isolation of the sex-determining gene Sex-lethal (Sxl) in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone, 1931) and characterization of its embryogenic, gametogenic, and tissue-specific expression // Gene. – 2018. – V. 668. – pp. 33–47.
15. Pinheiro M, Hattori G. Embryology of the swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) // Rev. Bras. Zool. – 2002. – V. 19 (2). – pp. 571–583.
16. Wear R.G. Life-history studies on New Zealand Brachyura. Embryonic and post-embryonic development of *Pilumnus novaezealandiae* Filhol, 1886, and of *Pilumnus* Bennett, 1964 (xanthidae, pilumninae) // New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. – 2010. – V. 1 (4). – pp. 482–535.
17. Yara Müller; Dib Ammar; Evelise Nazari Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods // Rev. Bras. Zool. – 2004. – V.21. – №1. – Curitiba Mar.

STUDY OF THE BALTIC PRAWN (*PALAEEMON ADSPERSUS* RATHKE, 1837) EARLY ONTOGENESIS

Zinabadinova S.S., Koulish A.V., Sukharenko E.V.

Kerch State Marine Technological University, Kerch, Russian Federation,
e-mail: sabrieshka@yandex.ru, kulish1972@mail.ua, helenasuhar@gmail.com

The embryonic development of the most numerous and only one commercial species from the forty-three species of the Decapoda in the Azov and Black Sea water area – *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 was studied. Near the fifty samples were collected in the south-west part of Kerch Strait water area. The data collection area had sandy and mud surface with *Zostera* sp. The four stages of embryonic development of *P. adspersus* were described. During the researching of the stages (the spawning egg, the germinal disk, the eye formation and the embryonized nauplius) the qualitative features of early and late embryogenesis were determined.

Embryonic marks of early ages of development was established – expansion of the perivitelline space, differentiation of the poles of the egg (formation of the germinal disk). It was revealed that at the later stages of development, the most informative were the formation of naupliar appendages (antennas, antennula, mandibles), eye primordia (differentiation of optical lobe into the cornea and the retina), as well as metamerization of the body parts, the ratio of egg yolk undisposal by the embryo and egg volume, telson differentiation.

Keywords: embryogenesis, embryonic markers, Decapoda; *Palaemon adspersus*.

Поступила в редакцию 02.11.2019 г.