

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ РОСТ ЗАРОДЫШЕЙ РОГОВОЙ КАТУШКИ *PLANORBARIUS CORNEUS* (GASTROPODA, PLANORBIDAE)

© 2016 г. А. А. Зотин*, Е. Ф. Кирик

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: zotin@idbras.ru

Поступила в редакцию 10.02.2016 г.

Окончательный вариант получен 07.04.2016 г.

С помощью прижизненной видеосъемки проведено исследование индивидуального роста зародышей роговой катушки *Planorbarius corneus*. Показано, что типы роста на протяжении эмбриогенеза изменяются. На стадии дробления вплоть до стадии бластулы линейные размеры незначительно, но достоверно, уменьшаются. Начиная со стадии бластулы и вплоть до стадии трохофоры, диаметр зародышей остается постоянным. Рост начинается со стадии средней трохофоры. На протяжении личиночных стадий (трохофоры и велигера) он идет синхронно (в единицах биологического времени Детлаф) как для зародышей в одной кладке, так и для зародышей в разных кладках. Тип роста в этот период — экспоненциальный. Затем наблюдается рассинхронизация роста для разных кладок. Зародыши в 8 кладках растут и развиваются медленнее и вылупляются позже, чем зародыши в остальных 5 кладках. Ускоренный рост идет по асимптотическому типу в соответствии с уравнением Берталанфи. Замедленный рост может быть описан линейным уравнением. Наблюдаемые различия, возможно, связаны с количеством зародышей в кладке. Все типы изменения линейных размеров, наблюдаемые в эмбриогенезе роговой катушки, могут быть описаны одним и тем же единым уравнением.

Ключевые слова: рост, зародыши, роговая катушка, брюхоногие моллюски

DOI: 10.7868/S0475145016050104

ВВЕДЕНИЕ

Наибольшее число работ, посвященных росту животных, проводится на взрослых особях или личинках (Мина, Клевезаль, 1976; Зотин А.А., 2009). Рост зародышей изучается значительно реже. Это обусловлено рядом объективных причин: невозможность получения нормального развития вне организма матери, непрозрачность яйцевых оболочек и т.п. (Белоусов, 2005; Gilbert, 2010). В этом отношении эмбриогенез пресноводных брюхоногих моллюсков, принадлежащих к отряду *Vasommatophora*, является исключением. Кладки представителей этого отряда прозрачные, их можно получить в любое время года. Зародыши нормально развиваются в воде в широком диапазоне факторов внешней среды, начиная с зиготы и вплоть до выхода из зародышевых оболочек. Зародыши в кладке развиваются синхронно, что позволяет исследовать эмбриогенез у нескольких зародышей одновременно.

Несмотря на очевидные преимущества, число работ, посвященных исследованию зародышевого развития моллюсков отряда *Vasommatophora* было сравнительно невелико (Мещеряков, 1975; Morrill, 1982). Положение изменилось в последние тридцать лет. Появилось большое число ра-

бот, связанных с изучением зародышей у представителей разных видов отряда (Goldberg, Kater, 1989; Marois, 1989; Goldberg et al., 1994, 2008, 2011; Marois, Croll, 1992; Voronezhskaya, Elekes, 1993; Croll, Voronezhskaya, 1996; Elekes et al., 1996; Diefenbach et al., 1998; Voronezhskaya et al., 1999, 2004; Croll, 2000; Nagy, Elekes, 2000; Cole et al., 2002; Przeslawski et al., 2004; Зотин А.А., Клейменов, 2006; Mapara et al., 2008; Byrne et al., 2009; Filla et al., 2009; Ebanks et al., 2010; Hiripi, Elekes, 2010; Shartau et al., 2010a, 2010b; Ивашкин, Воронезская, 2011; Кудикина, 2011) и т.д.

Развитие методов цифровой микровидеосъемки с последующим анализом компьютерных изображений, сделали возможным подробно исследовать динамику линейных размеров на протяжении всего эмбриогенеза у одних и тех же зародышей.

Основной целью данной работы было исследование индивидуального роста развивающихся зародышей *P. corneus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве родительских особей использовали роговых катушек *Planorbarius corneus* Linnaeus

(Gastropoda, Planorbidae) из аквариальной культуры. Кладки содержали в стеклянных чашках в отстоянной (не менее 2 суток) аэрированной водопроводной воде (40 мл) при различных температурах в интервале 17–33°C. Температура содержания была постоянной для каждой кладки в течение всего эмбрионального развития. Воду меняли ежедневно. Химический анализ воды не проводили.

Видеосъемку проводили в непрерывном режиме с ускорением в 100 раз с использованием стереоскопического микроскопа МБС-10 (Россия), цифровой камеры для микроскопа DCM800 (Micromed, Россия) и программного обеспечения ScopePhoto (версия 3.1.386, ScopeTek, Китай). Изображения отдельных кадров получали с помощью программы Медиапроигрыватель VLC (Версия 2.2.1, VideoLAN, Франция). Для определения возраста использовали системные часы ПК. Линейные размеры зародышей на полученных изображениях измеряли с помощью встроенной в программу ScopePhoto линейки с точностью 5 мкм. Измерения проводили только для тех зародышей, у которых не наблюдалось видимых тератогенных эффектов.

Определение стадии развития проводили в соответствии с таблицей нормального развития, опубликованной ранее (Zotin, Kirik, 2014). Возраст зародышей определяли по достигнутой стадии развития и в единицах биологического времени. Эти единицы были предложены Т.А. Детлаф (2001) и позволяют сравнивать зародышей, развивающихся в разных условиях. Строго говоря, единица биологического времени определяется как промежуток времени между метафазами двух первых последовательных делений дробления. Однако из-за невозможности точно определить моменты появления метафаз, мы принимали за единицу времени Детлаф (Дф) промежуток времени между появлением первой и второй борозд дробления (τ_0). Такой способ измерения вполне пригоден в случае голобластического дробления, наблюдаемого, в частности, у исследованного вида. Биологический возраст (τ) рассчитывали по формуле $\tau = t/\tau_0$, где t – возраст в физических единицах времени. В случаях, когда измерить τ_0 непосредственно не представлялось возможным из-за того, что видеосъемка начиналась на относительно поздних стадиях развития, для расчета τ_0 использовали уравнение, выведенное в предыдущей работе (Zotin, Kirik, 2014): $\tau_0 = 770t^{0-2.06}$ (час/Дф), t °C – температура. Точкой отсчета возраста считали появление первой борозды дробления ($\tau = 0$ Дф). В случаях, когда съемку начинали позже первого деления, расчет возраста производили относительно стадии, когда начиналось вращение зародыша (начало стадии ранней трохофоры). Для этой стадии биологический возраст считали равным $\tau = 35$ Дф.

В зависимости от формы зародыша измеряли разные линейные размеры. Для зародышей сферической формы (стадии от зиготы до средней

трохофоры и стадия поздней трохофоры) – диаметр; для зародышей, имеющих форму эллипсоида вращения (средняя трохофора) – наименьший размер (вдоль оси вращения); для остальных стадий – наибольший размер (вдоль кранио-каудальной оси).

Промежутки времени между последовательными измерениями на ранних этапах развития, вплоть до стадии средней трохофоры составляли 1 Дф; для личиночных стадий – 5 Дф; для более поздних стадий – 10 Дф. Более подробно измеряли зародышей из кладки № 14: промежутки между промерами 0.04 Дф от откладки до начала бластулы, 1 Дф от начала бластулы до вылупления.

Учитывали только тех зародышей, изображение которых в пределах 10 кадров от измеряемого возраста позволяло измерить требуемую длину. Данные, полученные для зародышей одного возраста из одной и той же кладки, усредняли.

Всего было исследовано 13 кладок (154 зародыша), характеристики которых приведены в табл. 1.

Основной тренд изменения размеров зародышей определяли методом сингулярного спектрального анализа с помощью программы “Гусеница” (версия 3.40, разработана компанией GistaT Group, Россия).

Полученные данные описывали объединенным уравнением роста (Зотин А.А., 2013; Zotin, 2015):

$$dZ/dt = V_0 c^t, \quad (1)$$

Z , мкм – параметр “чистого” роста, в данном случае равный линейным размерам зародыша; t , Дф – возраст зародыша в единицах биологического времени; V_0 , мкм/Дф – начальная скорость роста; c – коэффициент, определяющий изменение скорости роста.

Коэффициенты уравнения (1) определяли с помощью рекуррентной формы этого уравнения:

$$Z_{t+m} = c^m Z_t + d, \quad (2)$$

m , Дф – промежуток времени между измерениями; Z_{t+m} – параметр роста в возрасте $t+m$; Z_t – параметр роста в возрасте t . V_0 из уравнения (1) вычисляется по формуле $V_0 = (Z_0 - d) \ln(c)$, если $c > 0$ и $c \neq 1$; $V_0 = d/m$, если $c = 1$.

Возможность применения уравнения (2) оценивали с помощью критерия нелинейности. Сравнительный анализ роста в различных кладках на разных этапах развития проводили с помощью регрессионного анализа (Зотин А.А., 2000).

Влияние условий развития на рост зародышей оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (Ивантер, Коросов, 2010).

Таблица 1. Характеристика исследованных кладок *P. corneus*

№ кладки	$t^{\circ}\text{C}$	P , мм рт. ст.	τ_0 , час/Дф	N_1	Дата и время начала съемки	τ_1 , Дф	№ и название стадии на начало съемки	N_2	Дата и время окончания съемки	τ_2 , Дф	n , %
01	33	745	0.91	8	03.06.10 15:15	5	8. Средняя морула	5	09.06.10 22:00	170	63
02	21	749	0.59	9	28.06.10 21:10	15	15/2. Уплощенная бластула	6	03.07.10 2:30	200	67
04	22	749	0.63	12	07.07.10 23:09	13	15/2. Уплощенная бластула	11	12.07.10 13:20	187	92
06	19	749	0.61	11	13.07.10 19:36	0	2. Два бластомера	10	18.07.10 21:18	200	91
07	22	748	0.61	11	22.07.10 19:40	0	2. Два бластомера	11	27.07.10 18:45	195	100
08	24	749	1.01	6	02.08.10 16:45	35	19. Ранняя трохофора	3	08.08.10 13:40	175	50
09	27	748	1.79	7	31.08.10 16:07	35	19. Ранняя трохофора	5	08.09.10 23:00	146	71
10	27	748	1.91	11	15.09.10 23:45	27	17. Средняя гастрюла	4	25.09.10 15:20	148	36
11	33	754	1.98	13	27.09.10 15:30	27	17. Средняя гастрюла	9	11.10.10 22:56	200	69
12	21	743	1.27	14	12.10.10 21:05	-1	1/2. Зигота	6	23.10.10 12:00	200	43
13	22	745	1.07	12	10.11.10 21:05	0	2. Два бластомера	12	18.11.10 21:20	180	100
14	19	751	0.78	22	20.07.12 21:45	-1	1/2. Зигота	21	27.07.12 8:10	198	95
15	22	751	0.79	18	30.07.12 22:50	0	2. Два бластомера	13	06.08.12 14:30	201	72

Примечания. $t^{\circ}\text{C}$ – температура воды; P – атмосферное давление (данные с сайта <http://moskvameteo.ru>); τ_0 – коэффициент пропорциональности между физическими и биологическими единицами измерения возраста; N – число зародышей; D – дата и время; τ – биологический возраст зародышей; n – доля вылупившихся зародышей. Параметры с индексом 1 – на начало видеосъемки, с индексом 2 – на момент выхода зародышей из капсул.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные по изменению линейных размеров зародышей *P. corneus* позволяют разделить весь эмбриогенез на 4 стадии в зависимости от параметров единого уравнения роста (1): 1. Уменьшение размеров зародышей (стадии дробления). 2. Постоянные размеры (стадии бластулы, гастрюлы и ранней трохофоры). 3 Синхронный рост (стадии средней и поздней трохофоры). 4. Асинхронный рост (стадии велигера, великонхи, ползающего и вылупляющегося зародыша).

Ранние этапы развития

(стадии уменьшения и постоянства размеров)

На ранних этапах развития от начала откладки зигот и вплоть до начала стадии средней трохофоры все исследованные кладки развиваются син-

хронно и зародыши имеют приблизительно одинаковые размеры для одних и тех же возрастов, выраженных в биологических единицах времени.

Следует особо отметить причины включения стадии ранней трохофоры в этот раздел. Зародыши на этой стадии по ключевым признакам представляют собой промежуточную стадию между гастрюлой и трохофорой. Поэтому некоторые авторы относят этих зародышей к стадии поздней гастрюлы (Мещеряков, 1975), другие – выделяют их в особую стадию пре-трохофору (Taylor, 1977; Przeslawski, 2005). Мы включили этих зародышей в стадию трохофоры на том основании, что у них уже сформирован прототрох, в результате чего они начинают вращаться (Zotin, Kirik, 2014). Однако, поскольку увеличения размеров зародышей не происходит, мы сочли правильным включить стадию ранней трохофоры в данный раздел.

Таблица 2. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на ранних этапах развития

№ и название стадии	<i>t</i> , Дф	<i>L</i> , мкм	<i>n</i>	№ и название стадии	<i>t</i> , Дф	<i>L</i> , мкм	<i>n</i>
1. Зигота	-1	104	36	17. Средняя гастрюла	22	103	144
2. Два бластомера	0	117	36		23	111	144
3. Четыре бластомера	1	131	99		24	110	144
4. Восемь бластомеров	2	129	114		25	108	144
5. Ранняя морула	3	122	114		26	105	144
7–8. Средняя морула	4	118	114		27	108	171
	5	117	122		28	114	171
9. Поздняя морула	6	116	122		29	113	171
	7	115	122		30	114	171
10–11. Ранняя бластула	8	111	122		31	115	171
	9	114	122	32	116	171	
12–13. Средняя бластула	10	113	122	33	113	171	
	11	112	122	34	113	171	
14–15. Поздняя бластула	12	111	122	35	113	190	
	13	108	135	36	106	190	
15/2. Уплощенная бластула	14	106	135	37	104	190	
	15	105	144	38	107	190	
	16	111	144	39	107	175	
	17	109	144	40	107	175	
16. Ранняя гастрюла	18	107	144	41	109	175	
	19	108	144	42	111	175	
	20	104	144	43	111	175	
	21	104	144	44	107	175	

Примечания. *t* – возраст зародыша; *L* – средний размер зародыша; *n* – число измеренных зародышей. Ошибки средней величины диаметра зиготы приведены в тексте, для остальных возрастов они не превышают 1 мкм.

Средние значения диаметра зародышей на ранних этапах развития приведены в табл. 2. Динамика изменения средних размеров зародышей из кладки № 14 изучена более подробно (рис. 1).

Оплодотворение у *P. corneus* внутреннее, и откладываются зародыши на стадии зиготы. В свежееотложенной кладке зигота имеет средний диаметр 104 ± 2 мкм ($n = 36$). Затем происходит бласттрансформация. Через промежуток времени около 1 Дф (примерно 1 час при 25°C) зигота достигает размера 117 ± 3 мкм ($n = 36$), и формируется борозда первого деления дробления. В дальнейшем в результате делений дробления зародыши попеременно то расширяются сразу после деления, то уплотняются. Причем скорость сжатия превышает скорость расширения. В результате наблюдается тенденция к уменьшению средних размеров зародышей. Этот процесс продолжается в течение всего периода дробления (рис. 1а, 1б) и может быть аппроксимирован линейным реше-

нием уравнения (1): $Z = V_0 t + Z_0$ (Z_0 – размер зародыша в возрасте $t = 0$) со средними значениями коэффициентов $V_0 = -2.80 \pm 0.13$ мкм/Дф; $Z_0 = 134 \pm 1$ мкм. Величина V_0 достоверно отличается от 0 ($p < 0.001$).

На стадии ранней бластулы размеры зародышей стабилизируются на уровне 110 ± 1 мкм и остаются постоянными вплоть до стадии средней трохофоры (рис. 1в). Наблюдаемые колебания размеров в этот период не отличаются от стохастического шума. Этот тип динамики размеров зародышей также может быть описан единым уравнением (1): $Z \equiv Z_0$, $V_0 \equiv 0$.

Личиночные стадии (синхронный рост)

В зародышевом развитии *P. corneus*, как и у других легочных моллюсков, личиночные стадии

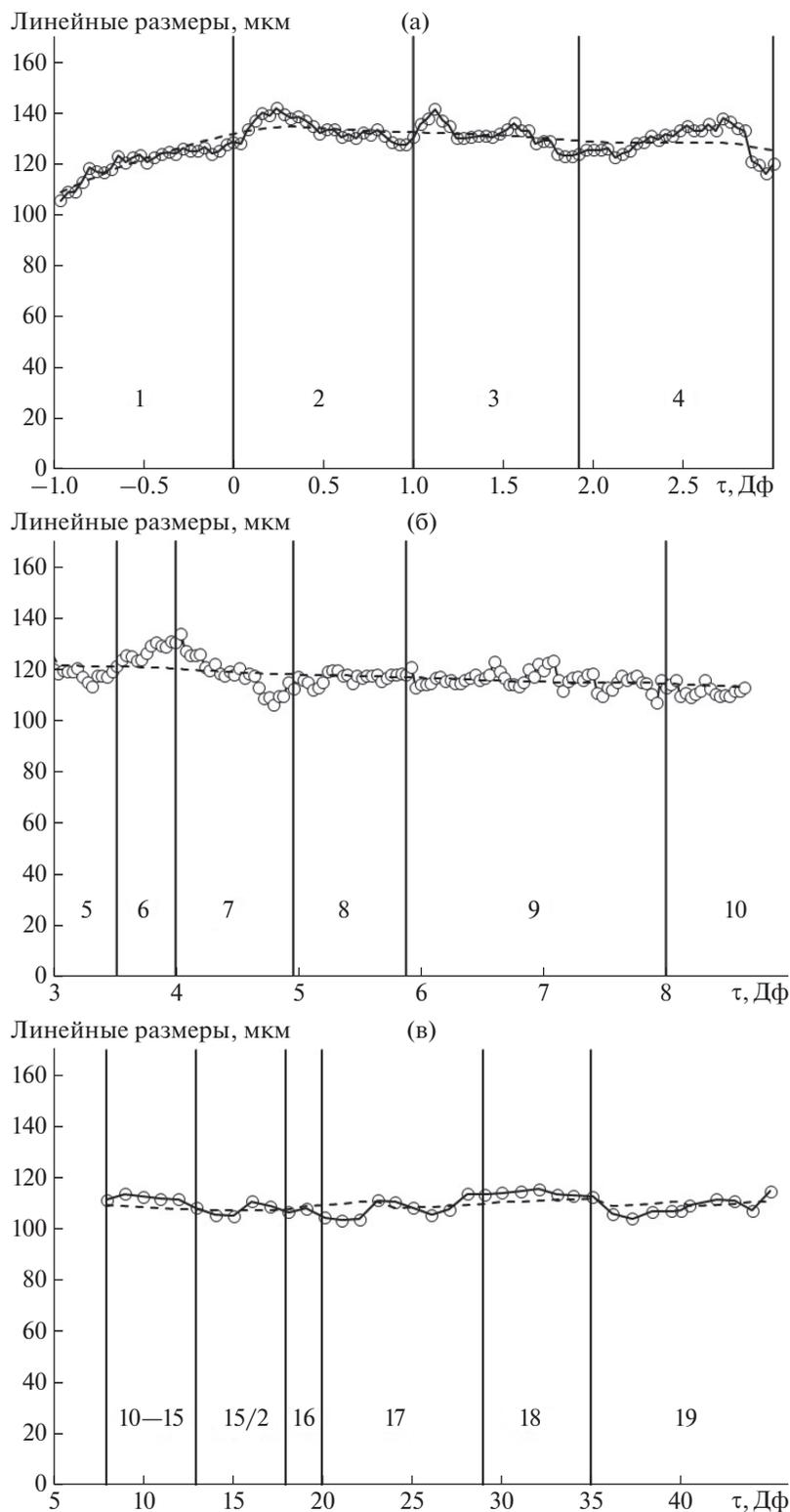


Рис. 1. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на ранних стадиях развития (на примере зародышей кладки № 14). По оси абсцисс – биологическое время (Дф). а – стадии синхронного дробления; промежуток между измерениями 0.04 Дф. б – стадии асинхронного дробления; промежуток между измерениями 0.04 Дф. в – стадии от бластулы до ранней трохофоры; промежуток между измерениями 1 Дф. Цифры – номера стадий: 1 – зигота; 2 – 2 бластомера; 3 – 4 бластомера; 4 – 8 бластомеров; 5 – 12 бластомеров; 6 – 16 бластомеров; 7 – 24 бластомера; 8 – 29 бластомеров; 9 – поздняя морула; 10–15 – бластула; 15/2 – уплощенная бластула; 16 – ранняя гастрюла; 17 – средняя гастрюла; 18 – поздняя гастрюла; 19 – ранняя трохофора. Кружки – экспериментальные данные. Сплошные вертикальные линии – границы стадий. Пунктирные линии – основной тренд, выделенный методом сингулярного спектрального анализа.

Таблица 3. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на личиночных этапах развития

№ и название стадии	<i>t</i> , Дф	$L \pm OC$, мкм	<i>N</i>	<i>n</i>
20. Средняя трохофора	45–49	116 ± 5	7	74
	50–54	127 ± 3	7	62
	55–59	138 ± 3	9	93
	60–64	151 ± 5	8	69
	65–69	168 ± 4	9	74
21. Поздняя трохофора	70–74	196 ± 5	9	67
	75–79	217 ± 8	8	80
22. Ранний велигер	80–84	260 ± 11	7	53
23. Средний велигер	85–89	300 ± 10	7	57
24. Поздний велигер	90–94	344 ± 6	7	64

Примечания. *t* – диапазон возрастов зародыша; *L*, мкм – средний размер зародыша; *OC* – ошибка среднего значения; *N* – число кладок; *n* – число измеренных зародышей.

проходят внутри кладок. Последовательно формируются две личинки: трохофора и велигер.

Рост зародышей начинается со стадии средней трохофоры. Размеры зародышей увеличиваются синхронно как в пределах кладок, так и в разных кладках. Средние размеры по всем исследованным кладкам приведены в табл. 3 и на рис. 2а.

Оценка коэффициентов рекуррентной формы единого уравнения роста (2) дает значения $c = 1.037 \pm 0.006$; $d = -12.1 \pm 6.5$ мкм. Достоверное отличие коэффициента *c* от 1 ($p < 0.001$) свидетельствует о том, что на личиночных стадиях рост зародышей идет по экспоненциальному типу. Более подробно изучен рост зародышей из кладки № 14 (рис. 2б). Значения коэффициентов уравнения (2), полученные после аппроксимации данных для зародышей этой кладки, равны $c = 1.029 \pm 0.004$; $d = 0.8 \pm 2.5$ мкм. Экспоненциальный характер роста на стадиях трохофоры и велигера наблюдается у каждого зародыша из этой кладки (22 особи). То есть экспоненциальный рост личинок роговой катушки не является следствием усреднения данных, а характерен для индивидуального развития *P. corneus*.

Поздние этапы развития (асинхронный рост)

Постличиночные стадии начинаются со стадии великонхи, когда велигер перестает свободно передвигаться внутри капсулы, прикрепляется к ее стенке, и переходит к окончательному метаморфозу. Окончание метаморфоза детектируется по изменению характера двигательной активности зародышей: перемещение великонхи происходит путем отрыва зародыша от поверхности капсулы с последующим его прикреплением к капсуле в другом месте, тогда как прошедший метаморфоз зародыш в связи с окончанием форми-

рования мышечной системы постоянно ползает по поверхности капсулы. Начало стадии вылупляющегося зародыша определяется по возрасту выхода из капсулы первого зародыша.

Для анализа роста мы учитывали только тех зародышей, выход которых из капсул был детектирован. В пределах одной кладки наблюдается синхронный рост зародышей. Диапазон возрастов от начала до окончания выхода ювенильных моллюсков из капсул составляет не более 10 Дф (10 час при 25°C).

Сразу после начала метаморфоза скорость роста резко изменяется и дальнейшее изменение размеров идет по одной из двух кривых, которые можно условно обозначить как замедленный и ускоренный типы роста.

Для одной и той же стадии развития при ускоренном росте зародыши крупнее по сравнению с зародышами, растущими по замедленному типу. Стадии развития при ускоренном росте достигаются раньше, чем при замедленном типе. Это позволяет говорить об асинхронности изменения размеров в период от начала метаморфоза до вылупления. Средние размеры вылупившихся зародышей и средний возраст вылупления для двух типов роста различаются с высокой степенью достоверности (табл. 4). Динамика изменения средних размеров зародышей для двух типов роста приведена в табл. 5. и на рис. 2.

Замедленный рост наблюдается у зародышей из кладок № 2, 4, 6, 7, 11, 12, 14 и 15. Оценка коэффициента *c* единого уравнения (1) для этого типа роста дает значение достоверно не отличающееся от 1: $c = 0.996 \pm 0.003$. То есть зависимость длины зародышей от возраста может быть описана линейным уравнением $Z = V_0 t + Z_0$ со средними значениями коэффициентов $V_0 = 3.51 \pm 0.08$ мкм/Дф; $Z_0 = 3.3 \pm 11.7$ мкм. Одна из кладок (№ 14) была изучена

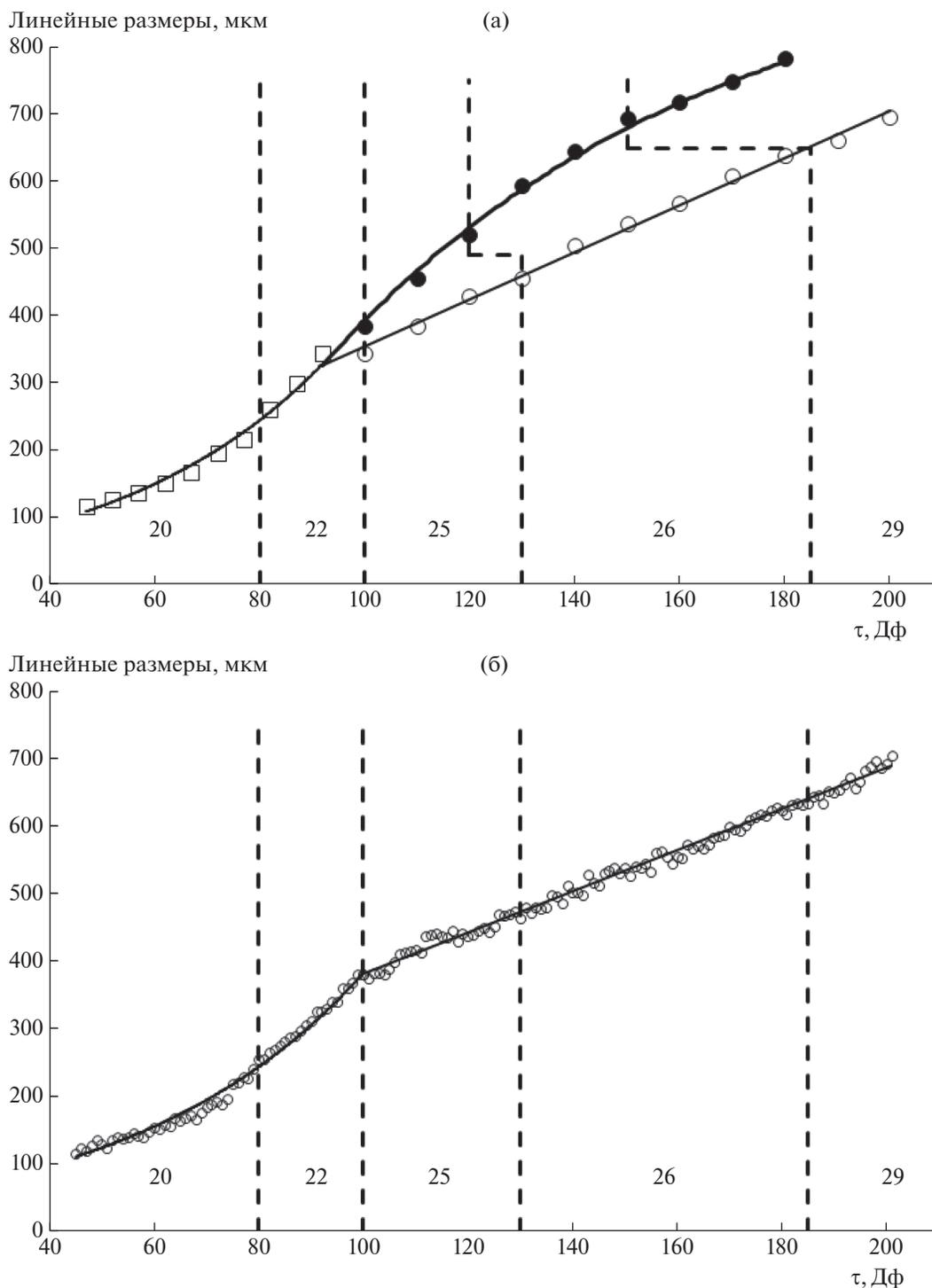


Рис. 2. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на личиночных и постличиночных этапах развития. По оси абсцисс — биологическое время (Дф). а — средние размеры по всем кладкам; промежуток между измерениями 5 Дф для личиночных стадий, 10 Дф — для постличиночных стадий. Квадраты — личиночные стадии; белые кружки — средние размеры зародышей с замедленным типом роста; черные кружки — средние размеры зародышей с ускоренным типом роста. б — средние размеры для зародышей кладки № 14; промежуток между измерениями 1 Дф. Сплошные линии — аппроксимация единым уравнением роста (1); пунктирные линии — границы стадий. Цифры — номера стадий: 20 — трохофора; 22 — велигер; 25 — великонха; 26 — ползающий зародыш; 29 — вылупляющийся зародыш.

Таблица 4. Средние значения параметров кладок с разными типами роста зародышей

Параметр	Замедленный тип роста (8 кладок)	Ускоренный тип роста (5 кладок)	Достоверность различия (уровень значимости)
L , мкм	696 ± 6	784 ± 5	<0.001
τ , Дф	198 ± 2	164 ± 7	<0.001
N	13.8 ± 1.5	8.8 ± 1.2	<0.05
n , %	79 ± 7	64 ± 11	Не достоверно
τ_0 , час/Дф	0.91 ± 0.17	1.34 ± 0.21	Не достоверно
$t^\circ\text{C}$	27.9 ± 1.8	25.8 ± 2.3	Не достоверно
P , мм рт. ст.	749 ± 1	747 ± 1	Не достоверно

Примечания. L – линейный размер вылупившихся зародышей; τ – биологический возраст вылупившихся зародышей; N – исходное число зародышей в кладке; n – доля вылупившихся зародышей; τ_0 – коэффициент пропорциональности между физическими и биологическими единицами измерения возраста; $t^\circ\text{C}$ – температура воды; P – атмосферное давление.

Таблица 5. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на постличиночных этапах развития

Стадия	$\Delta\tau$, Дф	Замедленный тип роста (8 кладок)		Ускоренный тип роста (5 кладок)	
		$L \pm \text{OC}$, мкм	n	$L \pm \text{OC}$, мкм	n
25. Великонха	95–104	344 ± 8	64	385 ± 6	29
	105–114	385 ± 8	51	456 ± 13	47
25. Великонха (для кладок с замедленным типом роста) или 26–28. Ползающий зародыш (для кладок с ускоренным типом роста)	115–124	430 ± 7	69	520 ± 8	42
26–28. Ползающий зародыш	125–134	457 ± 7	81	595 ± 10	35
26–28. Ползающий зародыш (для кладок с замедленным типом роста) или 29. Вылупляющийся зародыш (для кладок с ускоренным типом роста)	135–144	505 ± 7	86	644 ± 7	28
	145–154	537 ± 9	83	694 ± 7	34
	155–164	568 ± 10	72	719 ± 16	29
	165–174	609 ± 10	83	749 ± 14	20
29. Вылупляющийся зародыш	175–184	639 ± 6	77	784 ± 5	32
	185–194	662 ± 7	77		
	195–204	696 ± 6	77		

Примечания. $\Delta\tau$ – диапазон биологических возрастов зародыша; L – средний размер зародыша; OC – ошибка среднего размера; n – число измеренных зародышей.

более подробно. На графике зависимости длины зародышей от возраста отчетливо виден перелом скорости роста, совпадающий с началом метаморфоза (рис. 26). Коэффициент c для кладки № 14 для диапазона от начала метаморфоза до вылупления также достоверно не отличается от 1: $c = 0.995 \pm 0.011$. Аппроксимация данных линейным уравнением $Z = V_0 t + Z_0$ дает средние значения коэффициентов $V_0 = 3.04 \pm 0.03$ мкм/Дф; $Z_0 = 77 \pm 4$ мкм.

Ускоренный рост наблюдается у зародышей из кладок № 1, 8, 9, 10 и 13. Значения коэффициентов рекуррентного уравнения (2) составляют $c = 0.986 \pm 0.004$; $d = 126 \pm 17$ мкм. Коэффициент c

достоверно отличается от 1. Таким образом, кривая роста имеет горизонтальную асимптоту $Z_\infty = 9000$ мкм и соответствует зависимости, описываемой уравнением Бергаланфи.

Для того чтобы выявить факторы, определяющие тип роста зародышей в кладке, был проведен однофакторный дисперсионный анализ некоторых параметров развития. Из данных, приведенных в табл. 4, видно, что для кладок с разным типом роста не наблюдается достоверного влияния таких факторов, как доля вылупившихся зародышей, величина единицы биологического времени, температура воды, атмосферное давление.

Достоверное отличие ($p < 0.05$) выявлено только при сравнении среднего числа зародышей в кладке. Замедленный рост наблюдается в кладках с относительно большим числом зародышей (примерно 14 экземпляров на кладку). Ускоренный рост характерен для кладок, в которых число зародышей невелико (примерно 9 экземпляров на кладку).

ОБСУЖДЕНИЕ

Кривые роста животных отличаются значительным многообразием: экспоненциальная, параболическая, линейная, асимптотическая, S-образная и т.д. Особенно это касается зародышевого развития: типы роста зародышей различаются не только у разных таксономических групп, но и наблюдается их смена в течение индивидуального развития (Шмальгаузен, 1935; Мина, Клевезаль, 1976; Светлов, 1978; Зотин А.И., 1975; Новиков, 2000; Зотин А.А., 2006; Zotin, 2015).

Роговая катушка *P. corneus* в этом отношении не является исключением. Полученные результаты показывают, что на протяжении зародышевого развития происходит последовательная смена этапов уменьшения размеров, стабильных размеров, экспоненциального и линейного (или замедленного) типов роста.

Отсутствие роста на стадиях дробления является общей закономерностью для зародышей животных (Газарян, Белоусов, 1983; Карлсон, 1983; Moore et al., 2015; Gilbert, 2010). Незначительное, но достоверное уменьшение диаметра дробящегося зародыша *P. corneus* связано, по-видимому, с двумя процессами: постепенным расходом внутриклеточных питательных веществ, приводящим к снижению массы, и уплотнение зародыша в связи с замещением желточной массы на более плотную массу цитоплазмы, образующуюся в результате биосинтезов. Начало и постепенное ускорение биосинтетических процессов приводит к стабилизации размеров зародыша на стадии бластулы.

Рост начинается со стадии средней трохофоры и идет синхронно (в биологических единицах измерения времени), как для зародышей в одной кладке, так и для зародышей в разных кладках на протяжении личиночных стадий: трохофоры и велигера. Нарастание размеров идет по экспоненциальному типу. Такой тип роста часто наблюдается в зародышевом и личиночном развитии беспозвоночных, амфибий и рыб (Винберг, 1975), в том числе брюхоногих моллюсков (Зотин А.А., Клейменов, 2006).

Следует отметить, что в ряде работ в качестве единиц биологического возраста используется доля времени, прошедшего от начала развития по отношению к общей продолжительности эмбриогенеза в одинаковых условиях среды (Croll, 2000;

Nagy, Elekes, 2000; Cole et al., 2002; Goldberg et al., 2008, 2011). Для перерасчета между этими единицами времени (E%) и единицами времени Детлафа (τ) можно использовать формулу: $E\% = \tau/2$.

Одновременно с началом метаморфоза происходит резкий перелом скорости роста. Дальнейший рост у зародышей из разных кладок происходит по одной из двух кривых. Одна из них (замедленный рост) описывается линейным уравнением. В этом случае остается справедливой приведенная выше формула перерасчета между биологическими единицами времени, и, следовательно, единицы времени E% могут быть использованы. При росте по второй кривой зародыши вылупляются раньше, чем при замедленном росте, что делает невозможным определять биологический возраст по единицам времени E%.

Обращает на себя внимание дискретность кривых роста. Такое явление описано для взрослых животных разных таксономических групп (Мина, Клевезаль, 1976), в том числе для *P. corneus* (Кирик, Зотин А.А., 2012), получило название “канализованность” роста и обычно рассматривается как частный случай более общего понятия “гомеорез”. Для эмбрионального периода развития нам известны только работы Новикова (2000), в которых показано изменение типа роста зародышей разных видов рыб в зависимости от температуры среды.

Проведенный анализ показал, что в случае роговой катушки температура не оказывает достоверного воздействия на “выбор” кривой роста. Причины наблюдаемой асинхронии не вполне ясны. Из доступных для анализа факторов только среднее число зародышей в кладке оказалось достоверно различным для кладок с разными типами роста зародышей.

Было показано, что взрослые моллюски способны секретировать во внешнюю среду стабильные факторы, тормозящие рост и развитие зародышей *Lymnaea stagnalis* (Voronezhskaya et al., 2004), а также лабильные факторы, тормозящие рост других особей в постэмбриональном онтогенезе *P. corneus* (Зотин А.А., Кирик, 2011; Кирик, Зотин А.А., 2011). Возможно, различия роста связаны с началом секреции какого-либо из этих факторов на стадиях метаморфизирующего зародыша. Не исключено также, что изменение характера роста вызвано относительно большим снижением локальной концентрации кислорода вблизи кладок с большим числом зародышей.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-00397-а) и Президиума РАН (программы “Биоразнообразие живых систем”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2005. 368 с.
- Винберг Г.Г. Взаимозависимость роста и энергетического обмена у пойкилотермных животных // Количественные аспекты роста организмов. М.: Наука, 1975. С. 7–25.
- Газарян К.Г., Белоусов Л.В. Биология индивидуального развития животных. М.: Высшая школа, 1983. 287 с.
- Детлаф Т.А. Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001. 211 с.
- Зотин А.А. Статистическая оценка параметров аллометрических уравнений // Изв. РАН. Сер. биол. 2000. № 5. С. 517–524.
- Зотин А.А. Уравнения, описывающие изменение массы и интенсивности дыхания в постэмбриональный период развития животных // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 4. С. 404–413.
- Зотин А.А. Закономерности роста и энергетического обмена в онтогенезе моллюсков: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИБР РАН, 2009. 30 с.
- Зотин А.А. Обобщенное уравнение роста животных // XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. С. 187.
- Зотин А.А., Кирик Е.Ф. Секретия замедляющего рост фактора роговыми катушками *Planorbarius corneus* (Gastropoda) // XIV Междунар. совещ. и VII школа по эволюционной физиологии. Тезисы докладов и лекций. Санкт-Петербург. 24–29 октября 2011 г. СПб: ВВМ, 2011. С. 83–84.
- Зотин А.А., Клейменов С.Ю. Скорость потребления кислорода в зародышевом развитии обыкновенного прудовика *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 167–172.
- Зотин А.И. Количественные теории роста (история, современное состояние и перспективы) // Количественные аспекты роста организмов. М.: Наука, 1975. С. 267–272.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. 104 с.
- Ивашкин Е.Г., Воронежская Е.Е. Действие хлорпромазина на эндцитоз в бластомерах зародышей большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. и вьюна *Misgurnus fossilis* L. // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 4. С. 290–297.
- Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену, т. 1. М.: Мир. 1983. 357 с.
- Кирик Е.Ф., Зотин А.А. Зависимость размеров роговой катушки *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) от плотности популяции // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 6. С. 764–768.
- Кирик Е.Ф., Зотин А.А. Компенсационный рост роговой катушки *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Planorbidae) // Экология, эволюция и систематика животных: материалы международной научно-практической конференции. Рязань, 13–16 ноября 2012 г. Рязань: НП Голос губернии. 2012. С. 95–96.
- Кудикина Н.П. Влияние гормональных соединений на эмбриогенез прудовика *Lymnaea stagnalis* (L., 1758) // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 3. С. 213–218.
- Мещеряков В.Н. Прудовик *Lymnaea stagnalis* L. // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 53–94.
- Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.
- Новиков Г.Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. М.: Эдиториал УРСС, 2000. 296 с.
- Светлов П.Г. Физиология (механика) развития. Т. 1. М.: Наука, 1978. 264 с.
- Шмальгаузен И.И. Рост и дифференцировка // Рост животных. М.; Л.: Гос. изд-во биол. мед. лит., 1935. С. 74–84.
- Byrne R.A., Rundle S.D., Smirthwaite J.J., Spicer J.I. Embryonic rotational behaviour in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: influences of environmental oxygen and development stage // Zoology. 2009. V. 112. P. 471–477.
- Cole A.G., Mashkournia A., Parries S.C., Goldberg J.I. Regulation of early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis* // J. Exp. Biol. 2002. V. 205. P. 3143–3152.
- Croll R.P. Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in embryonic pond snails // Microsc. Res. Techniq. 2000. V. 49. P. 570–578.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Early elements in gastropod neurogenesis // Dev. Biol. 1996. V. 173. P. 344–347.
- Diefenbach T.J., Koss R., Goldberg J.I. Early development of an identified serotonergic neuron in *Helisoma trivolvis* embryos: serotonin expression, de-expression, and uptake // J. Neurobiol. 1998. V. 34. P. 361–376.
- Ebanks S.C., O'Donnell S.C., Grosell M. Acquisition of Ca^{2+} and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ for shell formation in embryos of the common pond snail *Lymnaea stagnalis* // J. Comp. Physiol. B. 2010. V. 180. P. 953–965.
- Elekes K., Voronezhskaya E.E., Hiripi L., Eckert M., Rapus J. Octopamine in the developing nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. // Acta Biol. Hungarica. 1996. V. 47. P. 73–87.
- Filla A., Hiripi L., Elekes K. Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* // Comp. Biochem. Phys. C. 2009. V. 149. P. 73–82.
- Gilbert S.F. Developmental Biology, 9th ed., Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 2010. 711 p.
- Goldberg J.I., Kater S.B. Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous-system // Dev. Biol. 1989. V. 131. № 2. P. 483–495.
- Goldberg J.I., Koehncke N.K., Christopher K.J., Neumann C., Diefenbach T.J. Pharmacological characterization of a serotonin receptor involved in an early embryonic behavior of *Helisoma trivolvis* // J. Neurobiol. 1994. V. 25. P. 1545–1557.
- Goldberg J.I., Doran S.A., Shartau R.B., Pon J.R., Ali D.W., Tam R., Kuang S. Integrative biology of an embryonic respiratory behaviour in pond snails: the “embryo stir-bar hypothesis” // J. Exp. Biol. 2008. V. 211. P. 1729–1736.

- Goldberg J.I., Rich D.R., Muruganathan S.P., Liu M.B., Pon J.R., Tam R., Diefenbach T.J., Kuang S. Identification and evolutionary implications of neurotransmitter-ciliary interactions underlying the behavioral response to hypoxia in *Lymnaea stagnalis* embryos // J. Exp. Biol. 2011. V. 214. P. 2660–2670.
- Hiripi L., Elekes K. A 5-HT1A-like receptor is involved in the regulation of the embryonic rotation of *Lymnaea stagnalis* L. // Comp. Biochem. Phys. C. 2010. V. 152. № 1. P. 51–61.
- Majara S., Parries S., Quarrington C., Ahn K.C., Gallin W.J., Goldberg J.I. Identification, molecular structure and expression of two cloned serotonin receptors from the pond snail, *Helisoma trivolvis* // J. Exp. Biol. 2008. V. 211. P. 900–910.
- Marois R. Embryonic development of *Lymnaea stagnalis*: general, neuronal and behavioral aspects. M. Sc. Thesis. Department of Psychology. Dalhousie University. Halifax. 1989. 219.
- Marois R., Croll R.P. Development of serotonin-like immunoreactivity in the embryonic nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* // J. Comp. Neurol. 1992. V. 322. P. 255–265.
- Moore K.L., Persaud T.V.N., Torchia, M.G. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 10th ed. Philadelphia: Saunders, 2015. 560 p.
- Morrill J.B. Development of the pulmonate gastropod, *Lymnaea* // Developmental Biology of Freshwater Invertebrates. Edited by: Harrison F.W., Cowden R.R. New York: Alan R. Liss. Inc. 1982. P. 399–483.
- Nagy T., Elekes K. Embryogenesis of the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. An ultrastructural study // J. Neurocytol. 2000. V. 29. P. 43–60.
- Przeslawski R. Combined effects of solar radiation and desiccation on the mortality and development of encapsulated embryos of rocky shore gastropods // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2005. V. 298. P. 169–177.
- Przeslawski R., Davis A.R., Benkendorff K. Effects of ultraviolet radiation and visible light on the development of encapsulated molluscan embryos // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2004. V. 268. P. 151–160.
- Shartau R.B., Harri S., Boychuk E.C., Goldberg J.I. Rotational behaviour of encapsulated pond snail embryos in diverse natural environments // J. Exp. Biol. 2010a. V. 213. P. 2086–2093.
- Shartau R.B., Tam R., Patrick S., Goldberg J.I. Serotonin prolongs survival of encapsulated pond snail embryos exposed to long-term anoxia // J. Exp. Biol. 2010b. V. 213. P. 1529–1535.
- Taylor H.H. The ionic and water relations of embryos of *Lymnaea stagnalis*, a freshwater pulmonate mollusc // J. Exp. Biol. 1977. V. 69. P. 143–172.
- Voronezhskaya E.E., Elekes K. Distribution of serotonin-like immunoreactive neurons in the embryonic nervous system of lymnaeid and planorbid snails // Neurobiology. 1993. V. 1. P. 371–383.
- Voronezhskaya E.E., Hiripi L., Elekes K., Croll R.P. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors // J. Comp. Neurol. 1999. V. 404. P. 285–296.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development. 2004. V. 131. P. 3671–3680.
- Zotin A.A. The united equation of animal growth // News of Science and Education. 2015. (in press).
- Zotin A.A., Kirik E.F. Intravital identification of stages of normal development of the great ramshorn snail *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Planorbidae) // News of Science and Education. 2014. V. 10. № 10. P. 56–77.

Individual Growth of the Great Ramshorn Snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Planorbidae) Embryos

A. A. Zotin and E. F. Kirik

Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: zotin@idbras.ru

Received February 10, 2016; in final form, April 7, 2016

Individual growth of the great ramshorn snail *Planorbarius corneus* has been studied by intravital video imaging. As has been observed, the types of growth change over the embryogenesis. The linear dimensions slightly but in a statistically significant manner decrease during the stages of cleavage to blastula. Starting from the stage of blastula to trochophore, the embryo diameter remains constant to commence increasing at the stage of middle trochophore. During the larval stages (trochophore and veliger), the growth is synchronous (in Dettlaffs, biological time units) for the embryos in both the same clutch and different clutches. The growth at that time is exponential but later desynchronizes in individual clutches. The embryos in eight clutches grew and developed slower and hatched later as compared with the remaining five egg clutches. An accelerated growth follows an asymptomatic pattern according to the von Bertalanffy equation. A retarded growth is describable with a linear equation. The observed differences are likely to be associated with the number of embryos in a clutch. All types of changes in the linear dimensions observed in the great ramshorn snail embryogenesis can be described with the same united equation.

Keywords: growth, embryos, great ramshorn snail, gastropods