

УДК 597.556.35:591.3(262.5)

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЧЕРНОМОРСКОГО КАЛКАНА (*SCOPHTHALMUS MAEOTICUS*) В ПЕРИОД ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

© 2019 г. А. Н. Ханайченко, В. Е. Гирагосов

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: a.khanaychenko@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2019; после доработки 30.07.2019;
принята к публикации 25.12.2019; опубликована онлайн 30.12.2019.

Черноморский калкан *Scophtthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) — ценный промысловый вид рыб и перспективный объект промышленной марикультуры. Потенциальная плодовитость калкана оценивается в 3–13 млн икринок, однако смертность потомства на ранних стадиях развития в море очень высока (до 90 %). В природе пелагическая икра калкана после оплодотворения поднимается к поверхностному слою моря через 2–3 ч. Она является частью нейстона до вылупления, и эмбриогенез происходит в поверхностных водах. Калкан наиболее уязвим на ранних стадиях своего развития: практически незащищённый эмбрион подвергается разнообразным неблагоприятным воздействиям. Выживаемость и физиологическое состояние личинок на этапе вылупления и до перехода к экзогенному питанию зависят от нормы морфологических характеристик зародышей в процессе их развития. Целью нашей работы было изучить нормы изменений морфологических характеристик калкана в период эмбриогенеза. Представлены результаты морфологического анализа стадий развития калкана от оплодотворения икры до выклева на основании исследования интактных икринок (более 2000 экз.) из разных партий, инкубированных в экспериментальных условиях. Для детального исследования морфологических структур эмбрионов проведена их фото- и видеосъёмка с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A720, подсоединённой к стереомикроскопу МБС-10 при увеличении 8×4, и аналоговой видеокамеры, подсоединённой к инвертированному микроскопу Nikon Eclipse TS100 при увеличении ×4, ×10, ×40. Морфологические особенности, характерные для последовательных стадий развития черноморского калкана (до и после оплодотворения, дробления, бластуляции, гастрюляции, эпиболии и нейруляции, вплоть до выклева), представлены серией цифровых фотографий с описанием трансформирующихся эмбриональных структур. Оплодотворённые пелагические икринки калкана, покрытые прозрачными оболочками, имеют диаметр от $(1,26 \pm 0,14)$ до $(1,31 \pm 0,15)$ мм, равномерно распределённый желток и одну круглую прозрачную жировую каплю 0,20–0,21 мм в диаметре, расположенную в верхней части желтка. Временные интервалы эмбрионального развития калкана в оптимальном для его эмбриогенеза температурном диапазоне (+14...+16 °С) представлены в единицах относительного времени (временного отрезка от оплодотворения до момента появления структуры, выраженного в процентах от общей длительности эмбриогенеза, % RT). Дробление начинается в возрасте 2,5 % RT. Десинхронизация деления клеток зародыша калкана, свидетельствующая о начале их дифференциации, наступает между 6-м и 7-м делением; бластодиск насчитывает около 128 бластомеров с плотными межклеточными контактами. В течение 10–11-го митотического деления (512–1024 клеток, около 12 % RT) происходит формирование желточного синцитиального слоя, контролирующего эпиболию, спецификацию клеток и морфогенез зародыша. В процессе гастрюляции образуется зародышевое кольцо (21 % RT), от которого около 25 % RT выделяется зародышевый щиток. К 31 % RT достигается 50 % эпиболии. В период 40–45 % RT на протяжении 70–75 % эпиболии возникает нейральный киль, различимы нотохорда и глазные пузыри, начинается сегментация, появляется

Купферов пузырьёк. К завершению эпиболии (49 % RT) сформированы глазные бокалы, в туловище эмбриона более 20 пар сомитов. К 60 % RT исчезает Купферов пузырьёк и образуется хвостовая почка, в глазных бокалах формируются линзовые плакоды. К 65 % RT происходит вакуолизация нотохорды, образуются миотомы и начинается рост хвостового отдела. К 70–75 % RT хвостовой отдел туловища эмбриона отделяется от желточного мешка. Около 80 % RT начинается нейромышечная моторика эмбриона; сердце слабо пульсирует; хвост эмбриона охватывает более 60 % поверхности желточного мешка; дифференцируются ксантофоры, придающие телу эмбриона розоватый оттенок. К 90–95 % RT у эмбриона калкана чётко очерчены непигментированные глазные чаши с хрусталиками; образовано по 3 симметричные слуховые камеры с отолитами; в туловище 33–38 сомитов; в дерме присутствуют меланофоры и ксантофоры; эмбрион совершает резкие движения хвостовым отделом и туловищем. Перед выклевом оболочка икринки становится эластичной, растягивается и разрывается в области головы. При +14...+16 °C выклев наступает через 114–94 ч после оплодотворения соответственно. У выклюнувшейся билатерально-симметричной личинки калкана (со стандартной длиной тела от $(2,53 \pm 0,13)$ до $(2,91 \pm 0,10)$ мм) сформированы все органы, глаза непигментированы, кишечный тракт закрыт; в течение 3–5 суток она развивается за счёт желточных запасов. Описания морфологических изменений эмбриона калкана при правильном развитии могут быть использованы для разработки критериев оценки качества развивающейся икры как в естественной среде обитания, так и в условиях культивирования.

Ключевые слова: черноморский калкан, эмбриогенез, морфология, *Scophthalmus maeoticus*

Наличие высококачественных икры и личинок — одно из важнейших условий эффективно-го воспроизводства рыб как в естественной среде обитания, так и в условиях культивирования. Кроме того, численность особей в формирующихся поколениях рыб зависит от популяционной плодовитости и количества производителей.

Плодовитость черноморского калкана *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814), одного из самых ценных промысловых видов рыб Чёрного моря и перспективного объекта промышленной марикультуры, оценивается в 3–13 млн икринок [8]. Между тем смертность пелагической икры калкана в море высока (80–90 % [5]; может превышать 99 % [8]) из-за её чувствительности к большому числу негативных факторов, причём как внешних (резкие колебания температуры, неблагоприятные гидрологические условия, шторм, наличие токсичных веществ в воде), так и внутренних (генетические аномалии, отклонения от нормы развития, связанные с неправильной экспрессией генов).

О целесообразности перехода от промысловой эксплуатации природных популяций калкана к аквакультуре свидетельствует опыт культивирования близкородственного калкану атлантического тюрбо, который в Европе является объектом промышленного выращивания уже более 30 лет. В 2016–2018 гг. годовое производство тюрбо (с товарной массой рыб 1–2,5 кг) европейской аквакультурной промышленностью составляло около 11 000 т и оценивалось в 75,6 млн евро; продукция этого вида в Китае (с массой рыб до 0,5 кг) превышала 60 000 т [13]. Европейская продукция искусственно воспроизводимого тюрбо ещё в 1999 г. достигала показателя максимального годового вылова калкана СССР в 1950-е гг. (2800 т) [10], что является доказательством высокого потенциала искусственного воспроизводства, превосходящего возможности традиционного промысла.

От того, насколько морфологические характеристики эмбрионов соответствуют норме развития, зависят выживаемость и физиологическое состояние личинок на этапе выклева, а также на каждом последующем этапе. Этиология отклонений в развитии калкана разнообразна и изучена недостаточно, поэтому исследование закономерностей его морфологической изменчивости в период раннего онтогенеза является важной задачей как для прогноза состояния природных популяций, так и для разработки аквакультурных методик выращивания молоди калкана в искусственных условиях. Нашей целью было изучить норму изменений морфологических характеристик калкана в период эмбриогенеза и описать их в свете современных представлений об эмбриологии рыб и литературных данных по развитию рыб рода *Scophthalmus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования особенностей эмбриогенеза *Scophthalmus maeoticus* послужила искусственно оплодотворённая икра, полученная от производителей калкана, которых отловили камбальными сетями в шельфовой зоне моря в районе г. Севастополя. Экспериментальные работы по оплодотворению и инкубированию икры проводили в 2006–2018 гг. в период естественного нереста калкана (апрель — май). Половые продукты сцеживали у текучих производителей как непосредственно на судне сразу после выборки сетей, так и в лабораторных условиях при содержании рыб в пластиковых бассейнах (при температуре воды +12...+13 °С). Икру осеменяли «сухим» способом: перемешивали её с неразбавленной спермой, а затем активировали морской водой. Оплодотворение производили при температуре не выше +13 °С. Для оплодотворения и инкубирования икры использовали черноморскую воду (солёность 18 ‰), предварительно отстоянную, прошедшую грубую фильтрацию, последовательную ультрафильтрацию через серию картриджных фильтров (10, 5, 1 мкм) и обработку ультрафиолетом. После оплодотворения икру тщательно промывали чистой морской водой и переносили в проточные инкубаторы при первоначальной загрузке из расчёта 500–1000 икринок на 1 л, при скорости водообмена 10 объёмов в сутки и с аэрацией, обеспечивавшей необходимое для нормального развития калкана содержание кислорода в воде — 7,5–8,5 мкг O₂ · мл⁻¹ [11]. Температуру при инкубировании поддерживали в оптимальном диапазоне (+14...+16 °С) [3, 23]. Эффективность оплодотворения икры оценивали через несколько часов после него на стадии 8–16 бластомеров, так как первые митотические деления могут происходить без оплодотворения.

Морфологические характеристики развивающихся эмбрионов калкана на разных стадиях эмбриогенеза исследовали по цифровым фотографиям (>5000 файлов) интактных икринок (>2000 экз.). Цифровую фотосъёмку осуществляли с помощью аналоговой видеокамеры, подсоединённой к микроскопу Nikon Eclipse-200, и цифровой фотокамеры Canon PowerShot A720, подсоединённой к стереомикроскопу МБС-10. Размеры икринок и эмбрионов и их морфологических элементов оценивали по окуляр-микрометру и по цифровым фотографиям.

При исследовании развития живых эмбрионов калкана отсутствовала возможность применения электронной микроскопии и гистологического анализа, поэтому для более достоверного описания процесса эмбриогенеза наши собственные материалы были органично дополнены описанием некоторых развивающихся в процессе эмбриогенеза структур по литературным данным.

Впервые описание эмбриогенеза черноморского калкана на основании анализа отловленных в море икринок сделала Т. В. Дехник [4]. Она условно разделила эмбриогенез этого вида на классические шесть этапов, каждый из которых уже содержит некоторые черты следующего: I — дробление (от оплодотворения до образования бластулы); II — бластуляция, заканчивающаяся образованием эпителиальной бластулы; III — гастрюляция (до образования бластопора); IV — органогенез (образуются слуховые капсулы и зачатки сердца, развивается пигментация до появления хвостовой почки); V — рост хвостового отдела (до начала пульсации сердца); VI — подвижный эмбрион (до вылупления). В описаниях развития атлантического тюрбо эмбриогенез обычно разделяют на этапы дробления, гастрюляции, нейруляции, органогенеза [17, 24].

В данном описании эмбриогенеза калкана мы придерживаемся терминологии и интервалов развития (оплодотворение, дробление, бластуляция, гастрюляция, органогенез, начало мышечной моторики и подготовка к вылуплению) согласно приведённым в работе Махотина [7]. В связи с тем, что описание развития эмбриональных структур калкана рассматривали в диапазоне оптимальных температур +14...+16 °С, при которых длительность разных этапов значительно отличается, хронология появления и трансформации морфологических структур в процессе эмбриогенеза калкана приведена в относительных единицах (относительном возрасте эмбриона в процентах от общей продолжительности эмбриогенеза, % RT) [22], аналогично безразмерной характеристике τ_0 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность оплодотворения икры калкана в значительной степени зависит от её состояния к моменту сцеживания. Отсутствие возможности вымета икры самками при их длительном пребывании в сетях в море или при содержании в бассейнах часто приводит к перезреванию икры или к получению смешанных порций — «зрелой» икры с примесью «перезрелой». Экспресс-метод оценки качества сцеженной икры заключается в определении её плавучести и соответствия морфологических характеристик ряду критериев.

Строение зрелого ооцита. Нормальная неоплодотворённая зрелая икра калкана имеет положительную плавучесть, бесцветна, прозрачна, неадгезивна, имеет большой центрально расположенный желток и одну жировую каплю на его поверхности (рис. 1А). Оболочка икры — прочная сложная геликоидная конструкция, состоящая из многочисленных решётчатых концентрированных слоёв кератиноподобных склеропротеиновых волокон в белковом матриксе [21]; она формируется ещё в яичнике и обеспечивает физическую защиту развивающемуся эмбриону. Первичная оболочка происходит от поверхностной протоплазмы ооцита и называется *zona radiata*. Сверху первичной оболочки икры образуется вторичная, продуцируемая фолликулярными клетками, — хорион.

Прозрачная светопреломляющая оболочка неоплодотворённой икры черноморского калкана, как и близкородственного тюрбо, имеет волнообразную структуру и пронизана отчётливо видимыми под электронным микроскопом гладкими порами — остатками радиальных канальцев, расположенных регулярно, на определённом расстоянии друг от друга [9, 15], через которые ооциты ассимилируют необходимые питательные вещества во время их развития в яичнике. Пористая и волнистая структура оболочки достаточно хорошо видна и под световым микроскопом (рис. 1В).

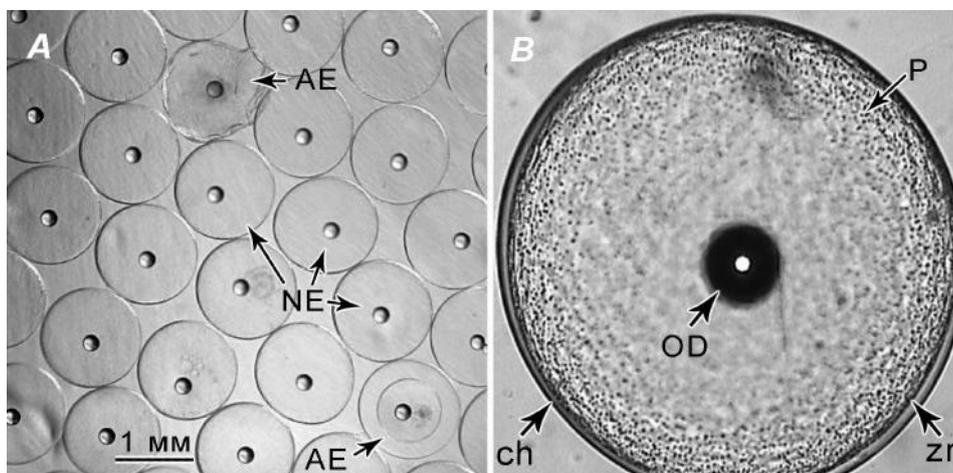


Рис. 1. Неоплодотворённая икра черноморского калкана: А — сцеженные икринки в верхнем слое воды; В — икринка крупным планом. Условные обозначения: NE — нормальная икра; AE — аномальная икра; OD — жировая капля; P — поры; zr — *zona radiata*; ch — хорион

Fig. 1. Unfertilized eggs of the Black Sea turbot: A – stripped eggs in the upper water layer; B – close-up of the egg. Symbols: NE – normal eggs; AE – abnormal eggs; OD – oil drop; P – pores; zr – *zona radiata*; ch – chorion

Эмбриогенез калкана.

Общая продолжительность эмбриогенеза составляла от 94 ч при +16 °С до 114 ч при +14 °С.

1 этап. Подготовка икринки к дроблению. Диаметр оплодотворённой икры, полученной в многочисленных экспериментах при искусственном оплодотворении с использованием гамет различных самцов и самок из нерестовой популяции калкана, отличался в разных партиях от $(1,26 \pm 0,14)$ до $(1,31 \pm 0,15)$ мм [12] (диаметр жировой капли — 0,21–0,22 мм) и находился в пределах вариаций размерных характеристик икринок калкана из моря, приведённых в результатах

ранних исследований ихтиопланктона [4], в которых диаметр икры составлял 1,10–1,33 мм, а диаметр жировой капли — 0,17–0,23 мм. После проникновения спермия через микропиле (диаметр $(4,2 \pm 0,4)$ мкм у видов рыб рода *Scophthalmus*) часть жидкости перивителлинового пространства экструдируется через микропилярный канал наружу и формирует пробку, закрывающую вход в микропиле [15], которая не только блокирует прохождение других сперматозоидов, предотвращая полиспермию, но и исключает проникновение в икру бактерий, вирусов и грибов, сохраняя стерильность перивителлинового пространства икры на протяжении эмбриогенеза. В результате активации икры прекращается блокировка процесса мейоза, завершается второе мейотическое деление, перестраивается ядерный аппарат и происходит сложная морфологическая и биохимическая трансформация экстраклеточного матрикса — преобразование структуры оболочки неоплодотворённой икры в структуру оболочки оплодотворённой икры [21]. Осмотически активные гликопротеиды втягивают воду между оболочками, вызывая их расслоение; внешняя оболочка икры поднимается и отделяется от внутренней цитоплазматической (вителлиновой) мембраны, между ними образуется перивителлиновое пространство, которое у икры калкана в норме занимает очень небольшой объём и заметно в основном на анимальном полюсе.

После обводнения происходит преобразование и затвердевание оболочки икры калкана, выдерживающей высокие физические нагрузки. В норме у правильно развивающейся икры калкана в период от дробления до ранней бластулы давление в жидкости перивителлинового пространства возрастает с $0,6 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^3$ Па, сохраняется в пределах от $3 \cdot 10^3$ до $3,5 \cdot 10^3$ Па до завершения гаструляции, падает на последующих (поздних) этапах до $1 \cdot 10^3$ Па и снижается перед выклевом до значений от $0,3 \cdot 10^3$ до $0,6 \cdot 10^3$ Па [9]. Сравнительно низкая плотность ($1,011 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$), высокая оводнённость (94,5–95,6 %) [2] и наличие жировой капли обеспечивают оплодотворённой икре калкана положительную плавучесть и распределение в верхнем слое черноморской воды солёностью 17,5–18 ‰. По данным растровой электронной микроскопии, *zona radiata* оплодотворённой икры калкана ($\sim 1,26$ мм в диаметре) состоит из 6 слоёв общей толщиной 3 мкм, которые пронизаны порами (диаметр 0,4 мкм), расположенными в определённом порядке, и плотностью $275\,000 \text{ пор}\cdot\text{мм}^{-2}$ [9].

Доля оплодотворённой икры варьирует в разных партиях от 5 до 95 %. Даже при использовании высококачественных половых продуктов определённая часть икры остаётся неоплодотворённой (рис. 2А). В среднем для партий икры с 90 % икринок с положительной плавучестью и партий спермы с более чем 70 % подвижных сперматозоидов доля оплодотворённой икры может достигать 90 %.

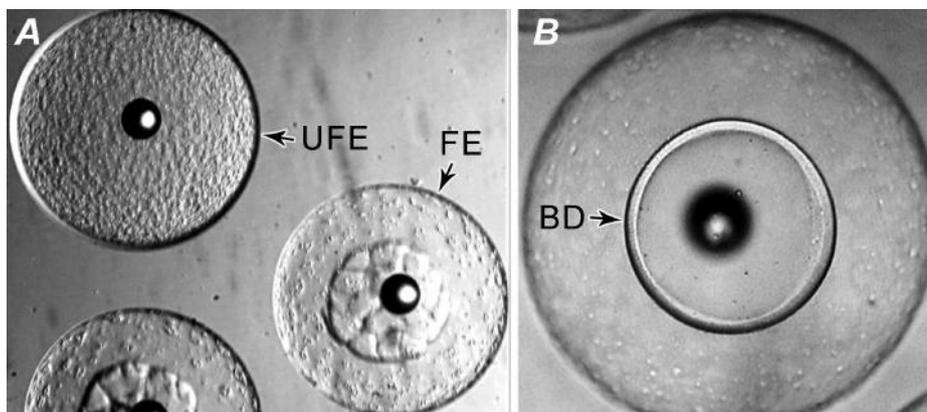


Рис. 2. Икра калкана после оплодотворения: А — икринки из одной порции (~ 4 ч после оплодотворения); В — оплодотворённая икринка с образовавшимся бластодиском ($\sim 1,5$ ч после оплодотворения). Условные обозначения: UFE — неоплодотворённая икринка; FE — оплодотворённая икринка на стадии дробления; BD — бластодиск

Fig. 2. Black Sea turbot eggs after fertilization: A – eggs from one batch (~ 4 h after fertilization); B – fertilized eggs with the formed blastodisc (~ 1.5 h after fertilization). Symbols: UFE – unfertilized egg; FE – fertilized egg at cleavage stage; BD – blastodisc

В течение периода от 0 до 1 % RT после соприкосновения оболочек икры и спермы цитоплазма икры, свободная от желтка, начинает аккумулироваться на анимальном полюсе. Приблизительно к 1,5 % RT образуется дископодобная выпуклость — зародышевый диск, или бластодиск (рис. 2В); завершается второе деление мейоза; формируется зигота, которая лежит на поверхности вегетативной части ооцита — на желточной массе, в центре которой находится одна жировая капля.

II этап. Дробление цитоплазматического диска оплодотворённой икры начинается с первого митотического цикла, во время которого, приблизительно в возрасте 2,5 % RT, образуются два одинаковых бластомера (рис. 3А). В результате двух непрерывных скоординированных процессов — кариокинеза (митотического деления ядра) и цитокинеза (деления клетки) бластодиска — восстанавливается характерное для соматических клеток ядерно-плазменное отношение, а важная для развития генетическая информация распределяется между разными клеточными областями. Из-за отсутствия роста клеток на начальных стадиях дробления совокупность бластомеров не превосходит по своим размерам зиготу. Вскоре происходит второе деление с образованием 4 бластомеров (рис. 3В), возвышающихся над цитоплазмой (рис. 3С).

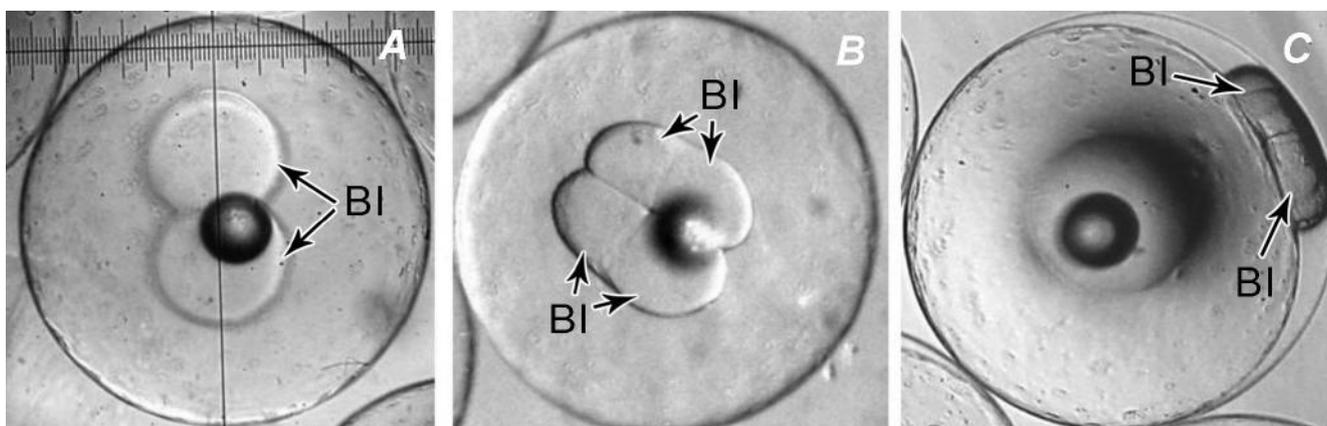


Рис. 3. Оплодотворённая икра калкана на этапе дробления: А — стадия 2 бластомеров; В — стадия 4 бластомеров; С — стадия 4 бластомеров (латеральная проекция). Условные обозначения: Bl — бластомеры

Fig. 3. Fertilized eggs of the Black Sea turbot at cleavage stage: A – stage of 2 blastomeres; B – stage of 4 blastomeres; C – stage of 4 blastomeres (lateral projection). Symbols: Bl – blastomeres

Спецификация клеток эмбриона калкана происходит уже после 4-го деления. По окончании 5-го митотического цикла, в возрасте 4,5 % RT, в результате деления 4 центральных бластомеров широтными, а 12 краевых — меридиональными бороздами формируются 32 бластомера, значительно отличающихся по форме и размеру (рис. 4А); образуется крупноклеточная морула. К 6,5 % RT, после 6-го по счёту, первого горизонтального деления, бластодиск калкана состоит из 64 бластомеров, а внутренние клетки формируют мембраны быстрее, чем краевые. Некоторая десинхронизация деления клеток зародыша калкана, свидетельствующая о начале их дифференциации между 6-м и 7-м делением, наступает после 7 % RT. Бластодиск насчитывает около 128 мелких бластомеров (рис. 4В) с плотно прилегающими друг к другу клеточными мембранами, образующими межклеточные контакты. Внешние, периферические бластомеры уплощаются, а внутренние, глубокие клетки, из которых в дальнейшем формируется эмбрион, округляются. После 8-го митотического цикла в зародыше калкана насчитывается около 256 клеток, упакованных в не менее чем 4 слоя. В этот период клетки ещё поддерживают коммуникацию, но затем возрастает асинхронность формирования поверхностных, внутренних и краевых бластомеров, и около 10 % RT эмбрион переходит к бластуляции.

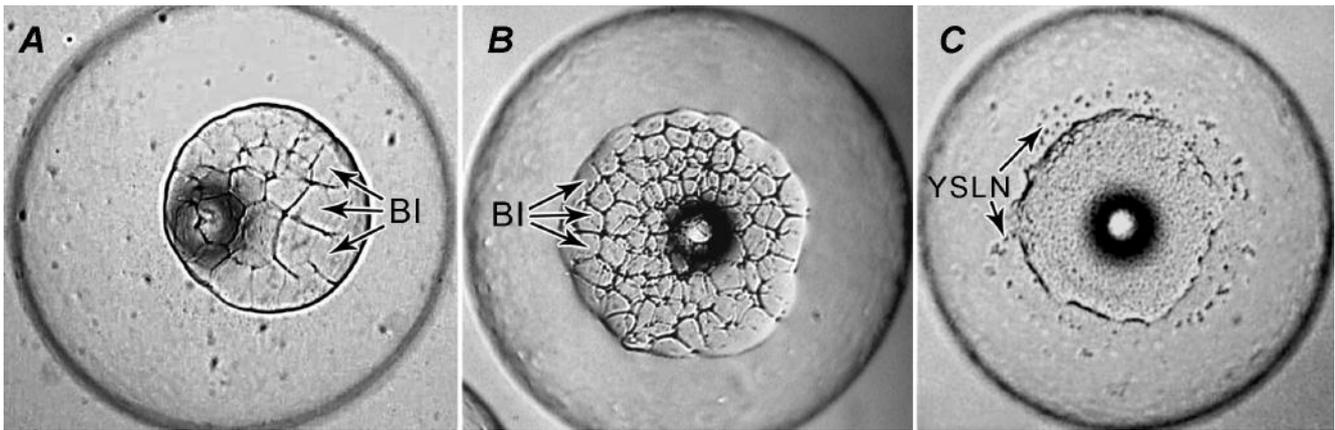


Рис. 4. Эмбрион калкана: А — на стадии 32 бластомеров; В — на стадии 128 бластомеров; С — на стадии > 512 бластомеров, по периферии бластодиска видны ряды синцитиальных ядер перибласта. Условные обозначения: Bl — бластомеры; YSLN — ядра перибласта

Fig. 4. Black Sea turbot embryo: A – stage of 32 blastomeres; B – stage of 128 blastomeres; C – stage of > 512 blastomeres, yolk syncytial layer nuclei at the periphery of the blastodisc. Symbols: Bl – blastomeres, YSLN – yolk syncytial layer nuclei (periblast nuclei)

III этап. Бластуляция характеризуется десинхронизацией деления клеток; она условно разделяется на раннюю, среднюю и позднюю бластулу и заканчивается образованием эпителиальной бластулы приблизительно в возрасте 15 % RT. В результате постоянного деления верхних бластомеров с плотными межклеточными контактами на ранней бластуле, называемой также высокой бластулой (high blastula) и бластомерной бластулой (по устаревшей терминологии), происходит куполообразное выпячивание бластодермы на анимальном полюсе. В течение средней бластулы одновременно с нормализацией ядерно-плазменного соотношения и удлинением клеточного цикла начинается период асинхронных делений клеток; пробуждается транскрипционная активность собственно генома зародыша; происходит синтез различных видов РНК на матрицах ДНК. С этой, критической стадии развития, называемой точкой перехода на стадии средней бластулы (*англ.* mid-blastula transition point, MBTP), клетки самого зародыша калкана способны к автономным движениям, необходимым для морфогенетических процессов, и зародыш становится полноценным эмбрионом, в котором начинает действовать его собственный геном. Если геном эмбриона не активируется, дальнейшего развития не происходит. К стадии поздней бластулы в зародышах калкана, как и всех костистых рыб, формируются морфологически обособленные группы клеток — поверхностные клетки с плотными межклеточными контактами (они образуют эпителиальный пласт — перидерму, которая покрывает эмбрион и желток) и глубокие клетки с неплотными контактами.

В течение 10–11-го митотического деления (приблизительно 512–1024 клетки) (около 12 % RT) в бластодерме окончательно дифференцируется особый слой. У крайних бластомеров происходит деление только ядер вместо деления цитоплазмы, клеточные мембраны отсутствуют; эти бластомеры начинают сливаться с субстанцией желтка. Ядра крайних бластомеров мигрируют из клеточного материала и располагаются несколькими рядами в цитоплазме, образуя специализированный слой клеток, не относящийся к структуре собственно зародыша, а являющийся как бы прослойкой между ним и желтком. Таким образом, образуется связанный с желтковыми запасами желточный синцитиальный слой (*англ.* yolk syncytial layer, YSL), называемый также перибластом (рис. 4С). Он играет ключевую роль в развитии эмбриона, контролируя эпиболию, морфогенез и метаболизм [16].

Перибласт становится симпластом (тканью, характеризующейся отсутствием границ между клетками и расположением ядер в сплошной цитоплазме) непрерывной системы протопластов, связанных плазмодесмами и ограниченных клеточной стенкой с полиморфными полиплоидными

ядрами [22]. Перибласт контролирует эпиболию, структурирование, спецификацию клеток и морфогенез слоёв зародыша в процессе гастрюляции. Высокодинамичные движения YSL скоординированы с движением поверхностных клеток предшественников [14].

IV этап. Гастрюляция у калкана, как и у других костистых рыб, происходит без образования бластопора и не приводит к формированию кишечной трубки [6]. У него отсутствует типичное для других позвоночных гастрюляционное подворачивание (инволюция); комплекс осевых зачатков эмбриона образуется в результате интенсивных делений и морфогенетических перемещений клеток разных слоёв, происходящих согласно их детерминации [14]. Она осуществляется двумя взаимно перпендикулярными перемещениями клеток бластодермы: эпиболией, или обрастанием желточной сферы бластодермой, увлекаемой перибластом, — пассивной миграцией клеток в меридиональном направлении, и осевой конвергенцией — активным движением клеток в широтном направлении к будущей оси билатеральной симметрии зародыша [6, 7].

В начале гастрюляции в процессе эпиболии желтка желточный цитоплазматический слой замещается многоядерным симпластом YSL. Формируется плотный сектор — утолщение из мигрировавших в результате центробежного движения клеток гипобласта, называемое зародышевым кольцом (*англ.* germ ring, GR) (рис. 5A). По всей окружности GR эмбрионов рыб рода *Scophthalmus* располагаются два слоя клеток, которые образовались из глубоких клеток, мигрировавших из центра бластодермы: поверхностный, выстилающий поверхность зародышевого диска, адгезивный слой клеток — эпибласт, который находится под кроющим эпителием и в непосредственном контакте с ним, и внутренний, мобильный слой — гипобласт, в котором мезодерма и эндодерма не разделены и образуют единый слой эмбриональных клеток — мезэндодерму (*син.* эндомезодерма); именно он находится в контакте с перибластом [24]. В клетках гипобласта увеличивается число клеточных органелл, возрастают их адгезия и активность. В начале обрастания они передвигаются по радиусам; затем их перемещения сочетаются с движениями осевой конвергенции (в широтном направлении к оси зародыша). Далее эпибласт развивается в эктодерму, а гипобласт дифференцируется в мезодерму и эндодерму. В дальнейшем: 1) эктодерма становится эпидермисом и нервной тканью; 2) из мезодермы образуются мышцы и кости; 3) эндодерма формирует ткани печени и кишечника.

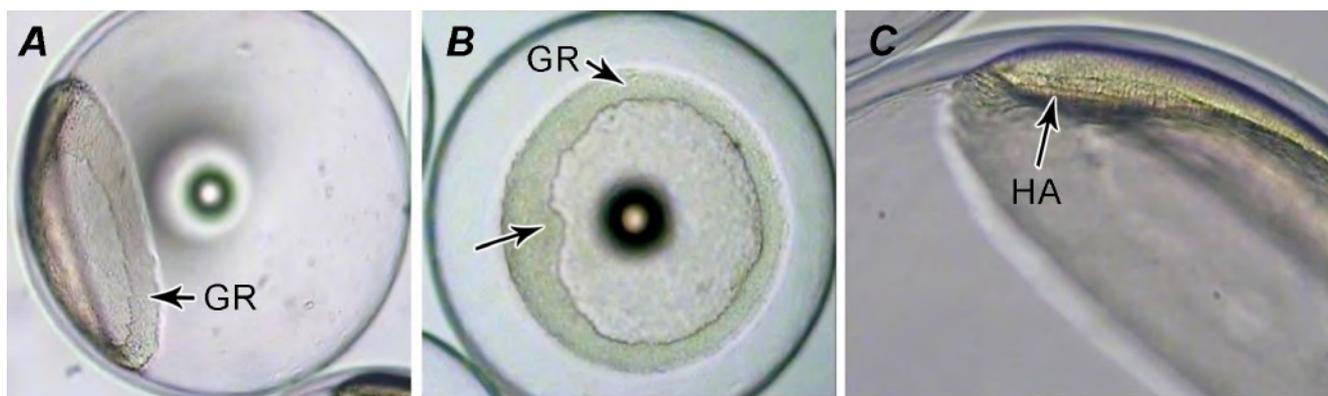


Рис. 5. Начало гастрюляции эмбриона калкана: А — зародышевое кольцо; В — зародышевое кольцо (стрелка указывает на участок зародышевого кольца, разрастающийся в направлении анимального полюса (будущего зародышевого щитка) соответственно будущей передне-задней оси зародыша); С — зародышевое кольцо (увеличение $\times 400$), будущая головная часть эмбриона калкана. Условные обозначения: GR — зародышевое кольцо, HA — будущая головная часть

Fig. 5. Start of gastrulation in the Black Sea turbot embryo: A – germ ring; B – germ ring (the arrow points to the GR area expanding to the animal pole (future embryonic shield) corresponding to future ante-posterior axis); C – germ ring (magnification $\times 400$), future head area of embryo. Symbols: GR – germ ring; HA – future head area

Ядра YSL продолжают делиться митотически, перибласт разрастается, его край активно сокращается и подтягивает в вегетативном направлении слой поверхностных клеток, которые увлекают весь слой перидермы. По мере эпиволии глубокие клетки бластодермы заполняют пространство между YSL и поверхностными клетками; площадь зародышевого диска и диаметр зародышевого кольца увеличиваются.

В процессе гастрюляции перемещения клеток эпибласта и гипобласта по своим траекториям, разрастание слоя перибласта от анимального полюса в сторону вегетативного и концентрация большей части клеток (зародышевого узелка) в дорсальном секторе GR (рис. 5B и C) приводят к его асимметрии и образованию зародышевого щитка (*англ.* embryonic shield, ES) в возрасте около 25 % RT, разрастающегося соответственно будущей передне-задней оси зародыша (рис. 6A и B). Зародышевый щиток считается организатором дорсо-вентральной эмбриональной оси зародышевой полоски.

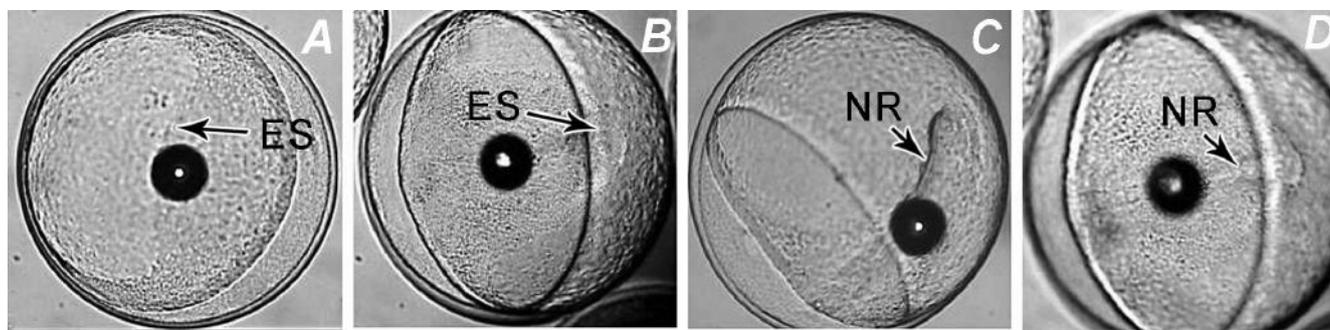


Рис. 6. Эмбрион черноморского калкана: А и В — разрастание зародышевого щитка от 20 до 50 % эпиволии; С и D — формирование зародышевой полоски и зачатка ното хорды (увеличение $\times 100$). Условные обозначения: ES — зародышевый щиток; NR — нейральная пластинка

Fig. 6. Black Sea turbot embryo: A and B — elongation of embryonic shield at 20 to 50 % epiboly; C and D — formation of embryonic band and notochord anlage (magnification $\times 100$). Symbols: ES — embryonic shield; NR — neural rod

Гастрюляцию можно считать завершённой по достижении 30 % эпиволии желточной сферы эмбриона [7], наблюдаемой у калкана в возрасте около 28 % RT. Почти одновременно с гастрюляцией в результате центробежной миграции внутренней массы бластомеров, изначально лежащих на разных уровнях (карта презумптивных зачатков у костистых рыб с самого начала является трёхмерной) [14] начинается закладка осевых зачатков.

V этап. Органогенез — определяющий период развития эмбриона калкана в возрасте от 29 до 70 % RT, в течение которого продолжается эпиволия бластодермой желточной сферы (вплоть до полного обрастания желтка и формирования хвостовой почки) и одновременно формируется осевой комплекс первичных зачатков.

В возрасте около 31 % RT формируется зачаток ното хорды — осевая мезодерма (*син.* хордомезодерма) — в гипобласте по средней линии зародышевого щитка калкана к 50 % эпиволии. Клетки хордомезодермы индуцируют дифференцировку прилегающей эктодермы в нейроэктодерму [24]. Утолщение нейроэктодермы формирует над краниальной частью зачатка ното хорды, в передне-заднем направлении, хорошо заметную нейральную пластинку (*англ.* neural rod, NR), выглядящую как утолщение вдоль медиальной оси зародышевого щитка (рис. 6C и D).

Когда бластодерма эмбриона калкана охватывает зародышевой полоской (валиком) желточную сферу на 60–70 % (к 40–42 % RT), в её анимальной (будущей головной) части, над хордой, в виде плотных тяжей вдоль будущей оси тела эмбриона формируются зачатки отделов головного мозга (рис. 7).

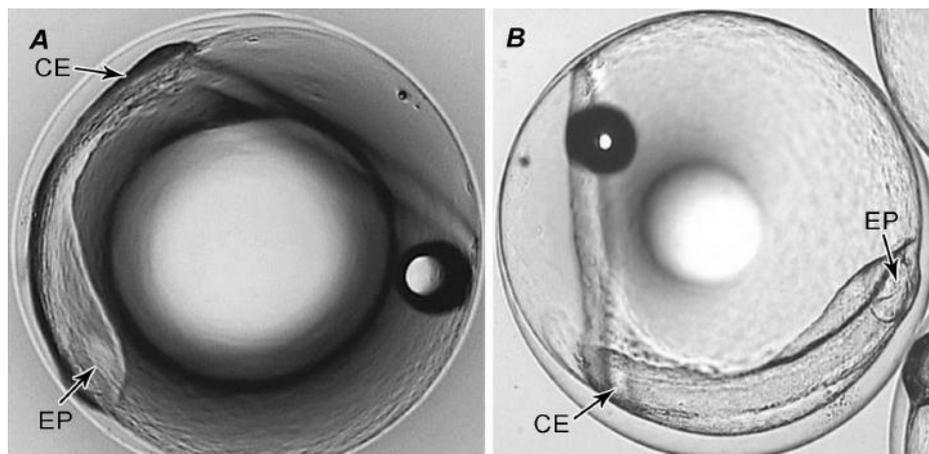


Рис. 7. Формирование зародышевой полоски эмбриона калкана: А — обрастание 60 %; В — 65 %. Условные обозначения: EP — зачатки глазных пузырей, CE — каудальная часть эмбриона

Fig. 7. Formation of Black Sea turbot embryo band: А – 60 % epiboly; В – 65 % epiboly. Symbols: EP – eye primordium; CE – caudal part of embryo

К 75 % эпиволии (в возрасте 45 % RT) в передней части по центру сплошной клеточной эмбриональной массы зародыша клетки нервной пластинки расширяются вентрально и формируют над мезодермальными клетками будущего рудиментарного мозга нейральный киль (*англ.* neural keel) (рис. 8А и В), вдавленный в ткань мезодермы. От передней части нейральной пластинки образуются три мозговых пузыря: передний (*prosencephalon*), который дифференцируется на передний (*telencephalon*) и промежуточный (*diencephalon*) мозг; средний (*mesencephalon*); задний (*rhombencephalon*). Оптические примордии (изначально сплошные эллиптические массы клеток глазных пузырей) формируются из боковых выпячиваний передней части нервной трубки, от *diencephalon*. Слуховые плакоды формирует *rhombencephalon* (рис. 8С).

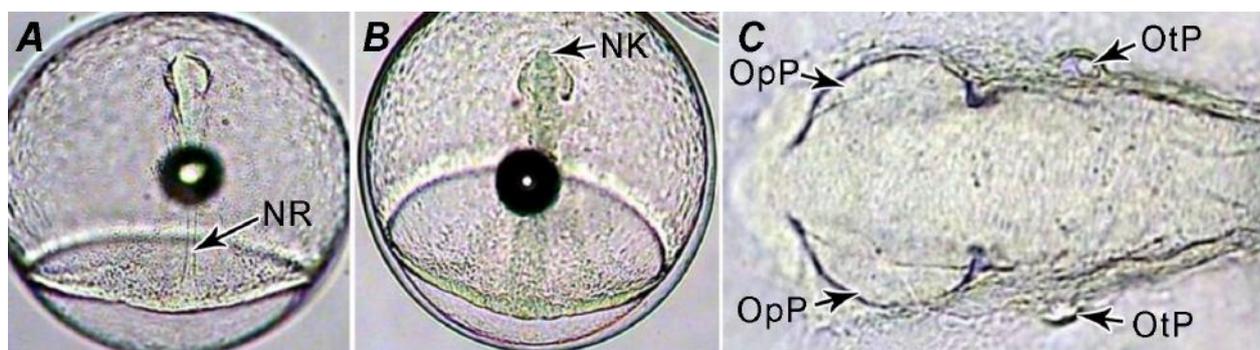


Рис. 8. Эмбрион калкана: А — формирование нейральной пластинки; В — формирование нейрального киль; С — формирование мозга, зачатков глаз и слуховых камер (увеличение $\times 100$). Условные обозначения: NR — нейральная пластинка; NK — нейральный киль; OpP — зачаток глаза; OtP — зачаток слуховой камеры

Fig. 8. Black Sea turbot embryo: А – neural rod formation; В – neural keel formation; С – formation of brain, otic and optic primordium (magnification $\times 100$). Symbols: NR – neural rod; NK – neural keel; OpP – optic primordium; OtP – otic primordium

Сегментация (разделение параксиальной мезодермы зародышевого валика сегментарными пластинками на отдельные параллельные блоки — сомиты), или сомитогенез, играет важную роль в формировании скелета и мышц. Первые сомиты у эмбриона калкана в середине туловища (рис. 9А) обнаруживаются вскоре после появления нотохорды и нейральной пластинки, ко времени замещения перибластом цитоплазматической мембраны желтка на 70 % (42 % RT). Параллельные границы

в гипобласте между осевой хордомезодермой (нотохордой) и параксиальной мезодермой сегментарной пластинки (она формирует сомиты) образуются в виде параллельных борозд, последовательно, одна за другой, в передне-заднем направлении, и уже отчётливо видны при 90 % обрастания. Формирование начальных сомитов у эмбрионов рыб рода *Scophthalmus* происходит независимо от температуры (в диапазоне +12...+16 °С) каждые 75 минут, однако в единицах относительного времени (стадиях развития в процентах от всей длительности эмбриогенеза) сомиты появляются при +12 °С раньше, чем при +16 °С [20].

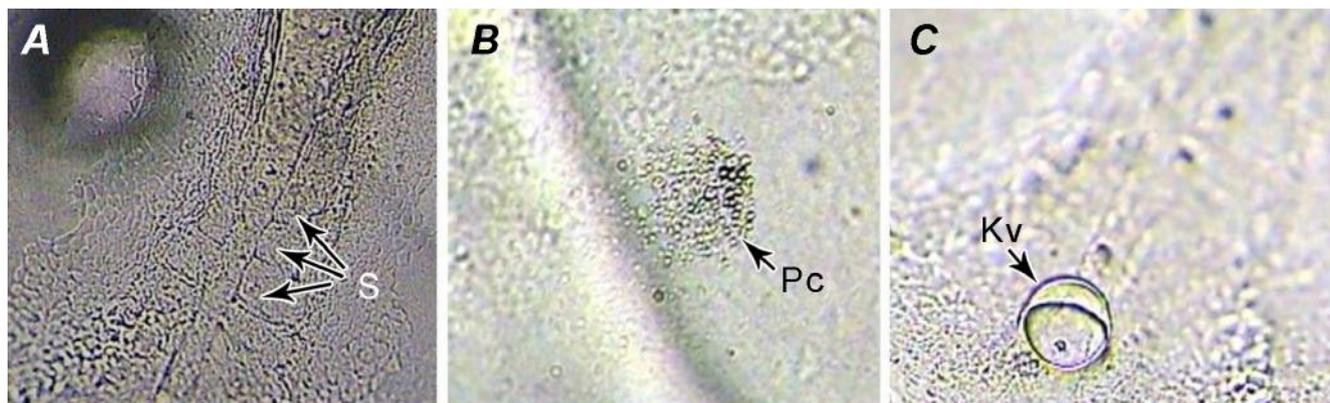


Рис. 9. Эмбрион калкана в начале сегментации (увеличение $\times 400$): А — формирование первых сомитов в середине туловища эмбриона (70 % эпиболии); В — клетки — предшественники Купферова пузырька; С — Купферов пузырёк. Условные обозначения: S — сомиты; Pc — клетки-предшественники; Kv — Купферов пузырёк

Fig. 9. Black Sea turbot embryo at the start of segmentation (magnification $\times 400$): A – formation of the first somites in the mid of embryo body (70 % epiboly); B – progenitor cells of Kupffer's vesicle; C – Kupffer's vesicle. Symbols: S – somites; Pc – cluster of progenitor cells; Kv – Kupffer's vesicle

В начале сегментации между желтком и каудальной частью эмбриона калкана, на его вентральной поверхности, появляется сперва еле заметный (видимый только при увеличении $\times 400$) зачаток временной структуры Купферова пузырька (*англ.* Kupffer's vesicle, Kv) (рис. 9В и С). По современным представлениям, Kv образуется следующим образом [19]: предшественники реснитчатых клеток Kv, дорсальные поверхностные эпителиальные клетки, в начале гастрюляции появляются в виде разбросанных по горизонтальной линии клеток, а в дальнейшем группируются (рис. 9В) и мигрируют к вегетативному полюсу, образуя в процессе быстрой эпителизации и цилиогенеза структуру из группы клеток, которая к окончанию эпиболии в области будущей хвостовой почки образует конденсированную клеточную массу, превращающуюся в Kv (рис. 9С). По данным гистологии эмбрионов рыб рода *Scophthalmus* [24], с вентральной стороны Kv формируют клетки внутреннего слоя YSL, а с дорсальной — призматические клетки. Хотя до настоящего времени все функции Kv окончательно не определены, считается, что реснитчатые клетки этой структуры во время раннего сомитогенеза определяют право-леворостороннюю симметрию сердца, мозга и кишечника [19]. Однозначно Kv является ориентиром появления будущей хвостовой почки и хвостового отдела калкана. Обнаружена связь между нормой развития Kv и нормой последующего развития хвостового отдела *Scophthalmus maoticus* [11].

В течение 80–85 % обрастания (рис. 10А и В) в эллипсоидных глазных пузырьках эмбриона калкана начинают образовываться полости, а Купферов пузырёк увеличивается в объёме. Достигнув вегетативного полюса, наружный перибласт смыкается, перидерма и края бластодермы окружают желтковую сферу. Процесс обрастания желтка бластодермой завершается в возрасте 49 % RT. К этому времени эмбрион и, особенно, его головная часть приобретают более чёткие очертания: в удлинённых глазных пузырьках образуются щели, которые затем преобразуются в глазные бокалы; в туловище эмбриона, расположенном от анимального к вегетативному полюсу и охватывающем половину

желточной сферы, формируются > 20 сомитов (рис. 10С). Со времени завершения эпиболии желток, окружённый перибластом и клеточным материалом, называется желточным мешком (*англ.* yolk sac, YS) и является неотделимой частью эмбриона калкана, так как выполняет множество функций, в том числе трофическую. Дифференцирующийся энтодермальный пласт продуцирует ферменты, расщепляющие желток [24].

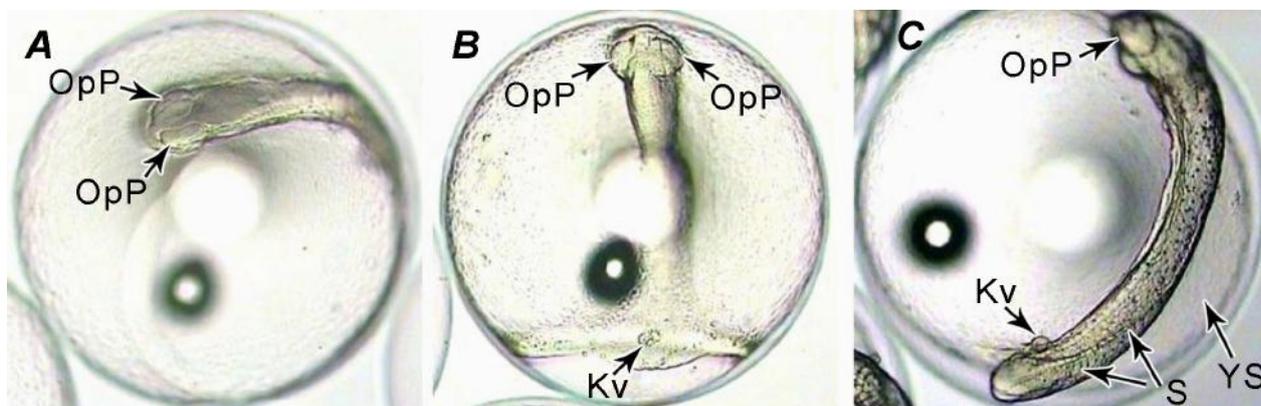


Рис. 10. Эмбрион калкана на стадии завершения эпиболии: А — 80 % эпиболии; В — 85 % эпиболии; С — завершение эпиболии, стадия сегментации (более 20 сомитов) — удлинённые глазные бокалы, в которых образована полость, Купферов пузырьёк в хвостовой части. Условные обозначения: OpP — глазной пузырьёк; Kv — Купферов пузырьёк; S — сомиты; YS — желточный мешок

Fig. 10. Black Sea turbot embryo at the end of epiboly: A – 80 % epiboly; B – 85 % epiboly; C – end of epiboly, segmentation stage (more than 20 somites), enlarged optic cups with a fissure, maximum volume of Kupffer's vesicle in the caudal part. Symbols: OpP – optic primordium; Kv – Kupffer's vesicle; S – somites; YS – yolk sac

Процесс осевой конвергенции клеток гипобласта завершается их агрегацией в каудальной части зародыша и формированием хвостовой почки (*англ.* tail bud, TB) — зачатка хвостового отдела эмбриона калкана. Когда Kv достигает максимального размера (рис. 11А), оказываясь внутри ткани будущей хвостовой почки, он уменьшается в объёме и исчезает. Образование зачатка хвостового отдела эмбриона калкана происходит к 60 % RT (рис. 11В). В этот же период в глазных бокалах формируются линзовые плакоды (рис. 11А и В).

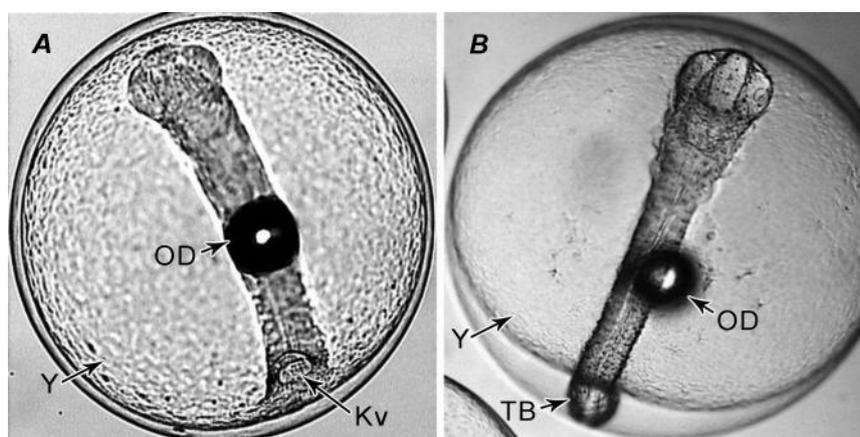


Рис. 11. Эмбрион калкана после завершения эпиболии: А — Купферов пузырьёк максимального объёма накануне образования хвостовой почки; В — формирование хвостовой почки. Условные обозначения: Kv — Купферов пузырьёк; OD — жировая капля; TB — хвостовая почка; Y — желток

Fig. 11. Black Sea turbot embryo after the end of epiboly: A – Kupffer's vesicle at its maximum volume prior formation of a tail bud; B – formation of the tail bud. Symbols: Kv – Kupffer's vesicle; OD – oil drop; TB – tail bud; Y – yolk

В хвостовой почке формируется участок ното хорды (рис. 12А), от которого происходит дальнейший рост хвостового отдела. Около 65 % RT начинается вакуолизация ното хорды: поверхностный слой клеток каждого сомита эпителизируется, а масса внутренних клеток формирует миотомы (мышечные сегменты). Они приобретают форму конусов, направленных вершиной в сторону головы эмбриона, и сохраняют метамерную организацию. Соседние миотомы отделены друг от друга поперечными миосептами из соединительной ткани. В результате формирования уплотнённой оболочки ткани, поддерживающей её упругость [24], «шевроноподобные» сегменты становятся хорошо заметны при увеличении $\times 100$ и в течение короткого периода времени выглядят «как стопка монеток» (рис. 12В).

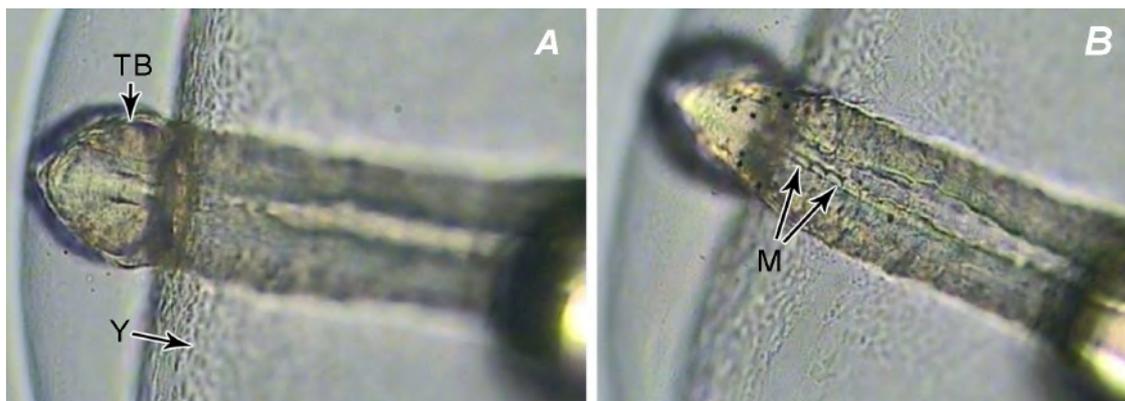


Рис. 12. Хвостовая часть эмбриона калкана: А — правильно сформированная хвостовая почка; В — посередине хвостовой части выделяются разделённые миосептами «шевроноподобные» миотомы. Условные обозначения: М — миотомы; ТВ — хвостовая почка; Y — желток

Fig. 12. Caudal part of the Black Sea turbot embryo: A – normal development of the tail bud; B – myotomes divided by myosepta in the middle of caudal part of embryo. Symbols: M – myotomes; TB – tail bud; Y – yolk

В период между 65 и 70 % RT из мигрирующих клеток нервного гребня начинают дифференцироваться хроматофоры, на туловище эмбриона калкана появляются точечные меланофоры (рис. 13А). Около 70–72 % RT в месте соединения мезодермальных боковых клеток под головным отделом зародыша калкана, от задней вентральной части среднего мозга в направлении передней части заднего мозга, сердечная трубка дифференцируется на предсердие и желудочек. Начинают формироваться свободные лопасти парных грудных плавников.

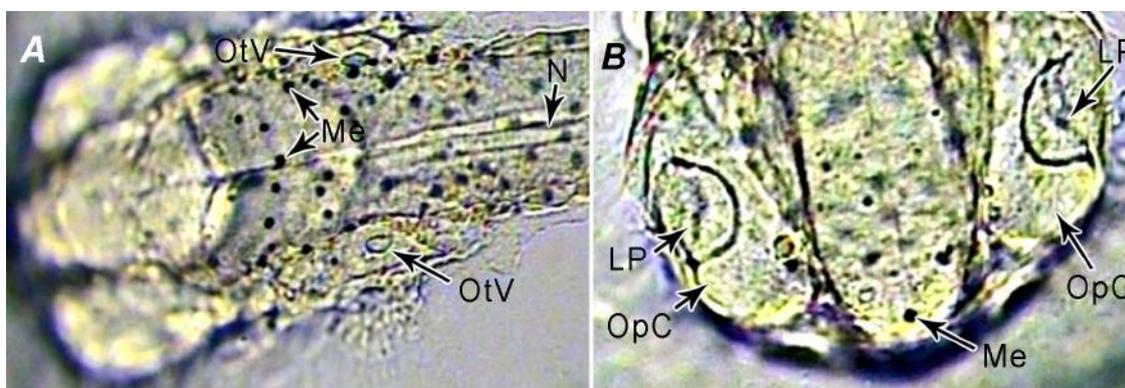


Рис. 13. Передняя и головная часть туловища эмбриона калкана. А — сегментированная ното хорда посередине, меланофоры, парные полости слуховых пузырьков; В — образование хрусталиковых плакод внутри полости глазной чаши. Условные обозначения: LP — хрусталиковые плакodes; Me — меланофоры; N — ното хорда; OpC — глазной бокал; OtV — слуховой пузырёк

Fig. 13. Forehead of the Black Sea turbot embryo: A – segmented notochord in the middle of the head, melanophores on the surface, paired otic vesicles; B – development of lens placodes in the optic cup. Symbols: LP – lens placode; Me – melanophores; N – notochord; OpC – optic cup; OtV – otic vesicle

Глазные бокалы, соприкасаясь с эктодермой головы эмбриона, начинают преобразовываться в двуслойную глазную чашу (рис. 13В): внутренний слой — зачаток сетчатки, наружный — пигментного эпителия, место перегиба внутреннего слоя в наружный — зачаток радужки [10]. Покровная эктодерма в месте соприкосновения с нейральным зачатком глаза начинает инвагинировать внутрь вторичной полости глаза, формируя хрусталиковые плакоды (рис. 13В), состоящие, согласно гистологическим исследованиям, из округлённых клеток [24]. Затем края хрусталиковой плакоды смыкаются, образуя зачаток хрусталика, приобретающий шарообразную форму (пузырёк) и отдаляющийся от покровной эктодермы, которая просветляется над ним и превращается в роговицу глаза (*лат. corneus* — роговой; *англ. cornea* — роговица глаза) [1, 24]. Дальнейшая дифференцировка отдельных элементов глаз калкана происходит по трём направлениям: 1) развитие (за счёт внутреннего и внешнего зародышевого листков) структур, воспринимающих свет и проводящих нервные возбуждения в центральные отделы мозга; 2) совершенствование структур, преломляющих свет и создающих изображение объектов на сетчатке (хрусталик, стекловидное тело); 3) дифференцировка оболочек глаза, выполняющих функции кровоснабжения, защитную и рефлекторную [10].

Растущий хвостовой отдел отделяется от границы желточной сферы, в нём дифференцируются хорда и спинной мозг, продолжают дальнейшую сегментацию и образование сомитов. Отчленение хвостового отдела от желточного мешка начинается в возрасте 70–75 % RT. В дальнейшем тело зародыша удлиняется за счёт сомитогенеза и укрупнения хвостовых мускульных сегментов.

VI этап. Начало нейромышечной моторики эмбриона калкана (нервно-мышечных сокращений мускульных сегментов туловищного отдела) регистрируется около 80 % RT. Пульсация сердца, дифференцированного к этому возрасту на 4 отдела [24], достигает 50 ударов в минуту. Хвост эмбриона охватывает более 60 % поверхности желточного мешка. Дифференцируются ксантофоры, придающие телу эмбриона розоватый оттенок.

К 90–95 % RT в головном отделе калкана чётко очерчены непигментированные глазные бокалы с хрусталиками, ниже по бокам — слуховые камеры с отолитами (рис. 14А и С), а в туловищном отделе отчётливо видна сегментированная хорда (рис. 14А). Хвост почти дорастает до головы. Дифференцирована непарная плавниковая складка, окаймляющая хвостовой отдел эмбриона (рис. 14А). В середине тела видны свободные лопасти грудных плавников (рис. 14С). Эмбрион не только производит свободные движения хвостовым отделом, но и изгибает тело, совершая волнообразные движения. На спинной стороне тела в дерме калкана наряду с меланофорами присутствуют ксантофоры (рис. 14В). На внутренней поверхности оболочки эмбриона из эпибласта дифференцируются хлорид-секретирующие клетки.

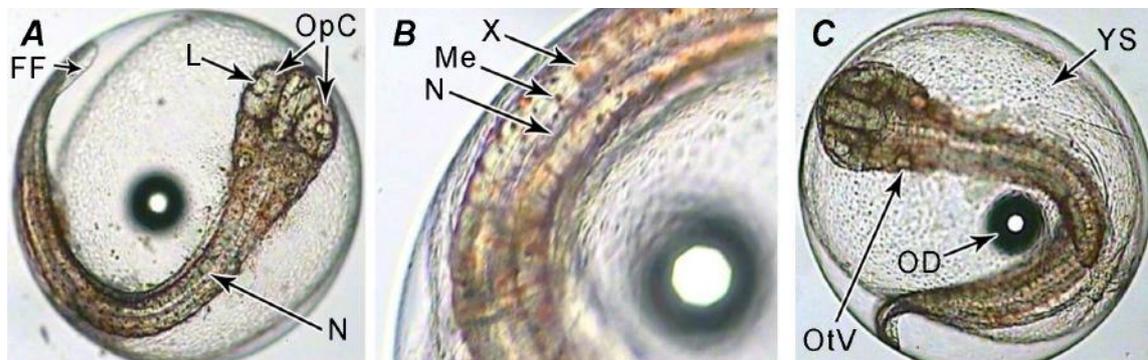


Рис. 14. Эмбрионы калкана: А — стадия свободного хвоста; В — ксантофоры и меланофоры на поверхности туловища; С — стадия подвижного эмбриона. Условные обозначения: FF — плавниковая складка; N — нотохорда; OpC — глазные бокалы; L — хрусталик; Me — меланофоры; X — ксантофоры; YS — желточный мешок; OD — жировая капля

Fig. 14. Black Sea turbot embryos: A – free tail stage; B – xanthophores and melanophores on the body surface; C – twisting of embryo. Symbols: FF – fin fold; N – notochord; OpC – optic cups; L – lens; Me – melanophores; X – xanthophores; YS – yolk sac; OD – oil drop

VII этап. Подготовка к вылуплению. Около 98 % RT хвост зародыша калкана охватывает большую часть желточного мешка, практически соединяется с головой и почти полностью отсоединяется от желточного мешка. Эмбрион свободно вращается внутри оболочки икринки. Эмбриональная моторика способствует конвективной и нестационарной диффузии кислорода и ионов в перивителлиновой жидкости, омывающей поверхность зародыша [9]. Перед головным отделом на желточном мешке, на переднем конце головы и над глазными бокалами появляются крупные округлые клетки, которые дифференцируются в железы вылупления. Под действием ферментов вылупления оболочка икринки становится эластичной, и во время энергичных вращений зародыша она постепенно растягивается (рис. 15А и В). Накануне выклева у эмбриона калкана уже различимы полукружные каналы в образованных на каждой стороне тела слуховых камерах (рис. 15С), в каждой из которых в норме сформирован один отолит.

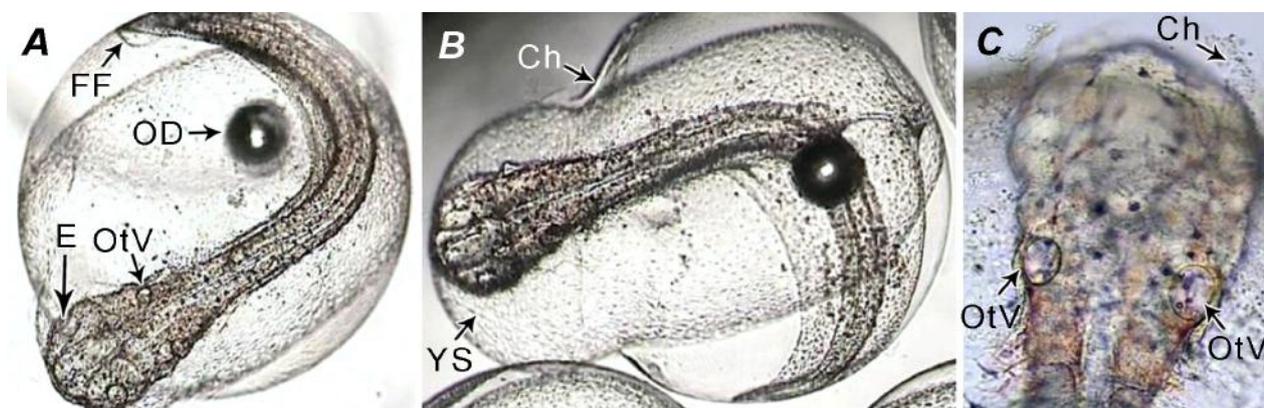


Рис. 15. Выход эмбриона калкана из оболочки икры: А — растягивание оболочки головным отделом; В — разрыв оболочки икры в области головы; С — разрыв хориона в области головы (увеличение $\times 400$). Условные обозначения: Ch — хорион; E — глаз; FF — плавниковая кайма; OD — жировая капля; OtV — слуховые камеры; YS — желточный мешок

Fig. 15. Black Sea turbot at hatching: A – stretching of the egg shell prior hatching; B – breaking through the chorion of the embryo head; C – chorion rupture at the head area (magnification $\times 400$). Symbols: Ch – chorion; E – eye; FF – fin fold; OD – oil drop; OtV – otic vesicles; YS – yolk sac

Перед выклевом в туловище эмбрионов калкана насчитывается 33–38 сомитов; сердечный ритм достигает 75–80 ударов в минуту. Активные резкие движения эмбриона приводят к растягиванию, утончению и разрыву оболочки, а также к выходу из неё эмбриона головой вперёд (рис. 15А, В и С). Обонятельные плакоды эмбрионов рыб рода *Scophthalmus* перед выклевом трансформируются в обонятельные ямки [18]. Во время выхода эмбриона из оболочки около 20–25 % массы икринки высвобождается в окружающую среду.

Общая продолжительность эмбриогенеза при повышении температуры инкубации икры с +14 до +16 °С сокращается с 114 до 94 ч. Индивидуальный процесс выклева эмбриона из оболочки продолжается около 1 ч. В партии правильно развивающейся качественной икры выклев происходит довольно синхронно — в течение 1–2 ч, в то время как в партиях икры с разнородным физиологическим и генетическим материалом и при низких температурах выклев может растянуться на 6–8 ч.

Хронология изменений и появления новых эмбриональных структур на рассмотренных стадиях эмбриогенеза калкана представлена на шкале морфологических изменений (рис. 16) в единицах относительного времени (% RT) в диапазоне оптимальных температур +14...+16 °С.

Непосредственно после выклева голова предличинки калкана плотно прилегает к желтку (рис. 17А), на поверхности которого расположены хлоридные клетки. Большой овальный желток занимает до $\frac{2}{3}$ туловища (рис. 17В). В непигментированных глазах чётко очерчены зрачки. По бокам туловища распределены параллельные ряды меланофоров.

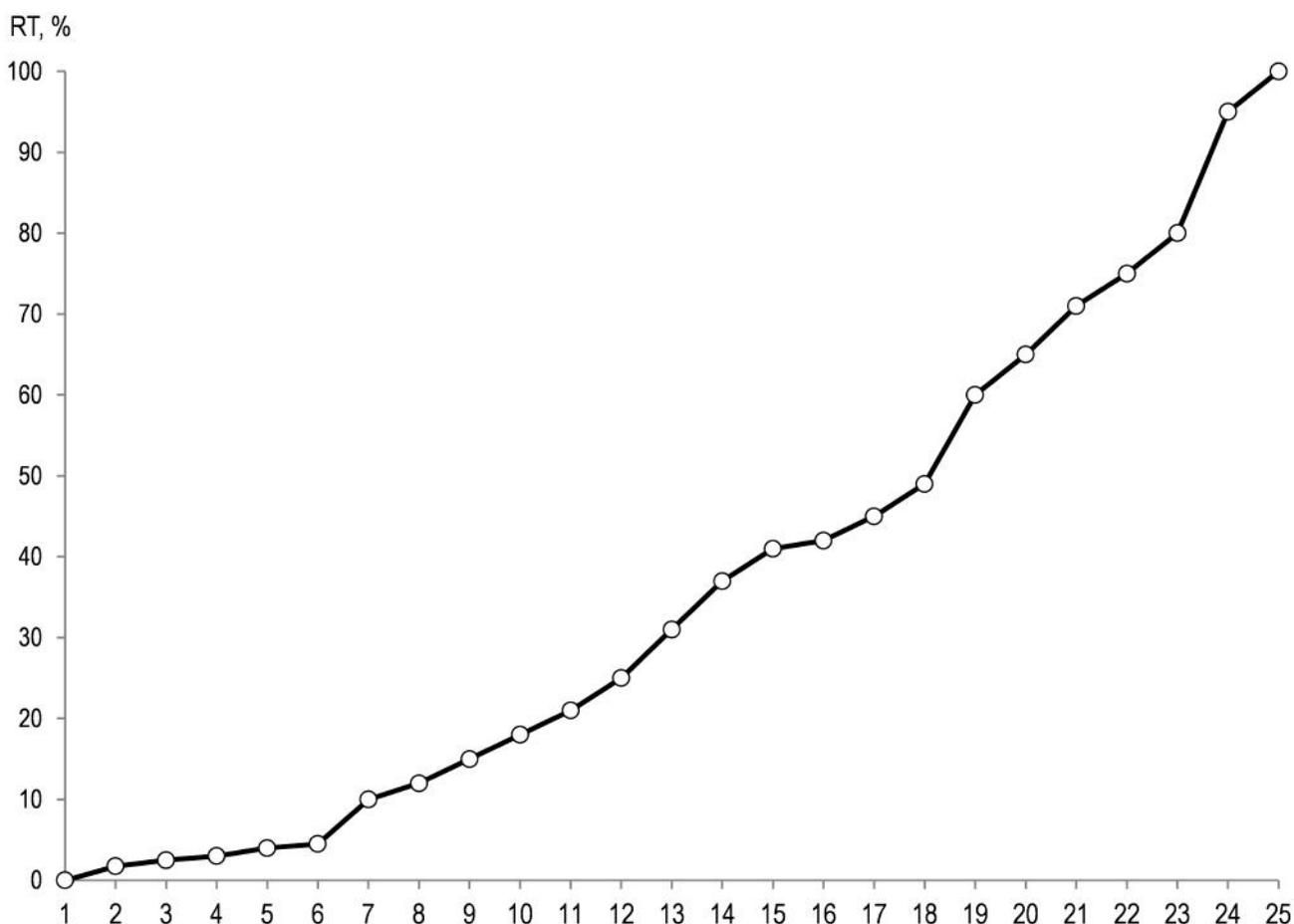


Рис. 16. Хронологическая шкала морфологических изменений калкана в течение эмбриогенеза, представленная в единицах относительного времени (% RT, временной отрезок от оплодотворения до момента появления структуры, выраженный в процентах от общей длительности эмбриогенеза) в диапазоне оптимальных температур +14...+16 °С: 1 — оплодотворение; 2 — бластодиск, зигота; 3 — 2 бластомера; 4 — 4 бластомера; 5 — 16 бластомеров; 6 — 32 бластомера; 7 — 256 бластомеров; 8 — образование перибласта; 9 — эпителиальная бластула; 10 — гастрюляция; 11 — зародышевое кольцо; 12 — зародышевый щиток; 13 — 50 % эпиболии; 14 — нейральный киль; 15 — первый сомит; 16 — Купферов пузырь; 17 — 75 % эпиболии; 18 — завершение эпиболии; 19 — хвостовая почка; 20 — рост хвостового отдела; 21 — пульсация сердца; 22 — свободный хвост; 23 — нейромаскулярная моторика; 24 — активный эмбрион; 25 — выклев

Fig. 16. Scale of morphological changes during Black Sea turbot embryogenesis in relative time units (% RT, a time interval from fertilization until the emergence of morphological structure in percentage of the embryogenesis total duration) in the range of optimal temperatures +14...+16 °C: 1 – fertilization; 2 – blastodisc, zygote; 3 – 2 blastomeres; 4 – 4 blastomeres; 5 – 16 blastomeres; 6 – 32 blastomeres; 7 – 256 blastomeres; 8 – yolk syncytial layer; 9 – epithelial blastula, gastrulation; 11 – germ ring; 12 – embryonic shield; 13 – 50 % epiboly; 14 – neural keel; 15 – 1st somite; 16 – Kupffer's vesicle; 17 – 75 % epiboly; 18 – end of epiboly; 19 – tail bud; 20 – tail growth; 21 – heart beating; 22 – free tail; 23 – neuromascular activity; 24 – active embryo; 25 – hatching

Предличинка калкана после выклева билатерально-симметрична; её глаза не пигментированы; реакция на свет отсутствует. Стандартная длина тела (SL) находится в пределах от $(2,53 \pm 0,13)$ до $(2,91 \pm 0,10)$ мм в зависимости от наследственности и температурных условий, при которых проходил эмбриогенез. В течение нескольких часов после выклева голова предличинки отделяется от желтка (рис. 18). Большой овальный желточный мешок, занимающий до 50 % длины тела, и жировая капля диаметром 0,21–0,22 мм, расположенная в задней трети желточного мешка, создают положительную плавучесть, удерживая малоподвижных предличинки в подповерхностном слое воды (брюшной стороной вверх).

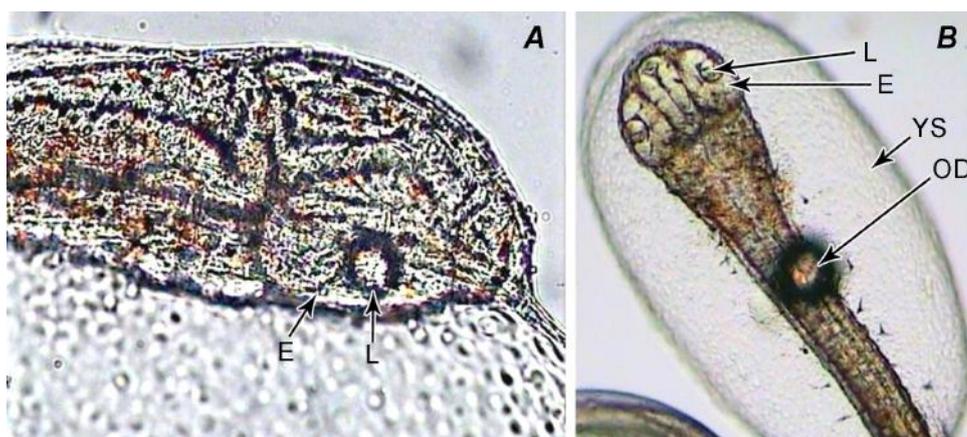


Рис. 17. Предличинка калкана непосредственно после выклева: А — передняя часть тела; В — дорсальная проекция тела. Условные обозначения: Е — глаз; L — хрусталик; OD — жировая капля; YS — желточный мешок

Fig. 17. Black Sea turbot pre-larvae immediately after hatching: A – frontal part of the body; B – dorsal projection of the body. Symbols: E – eye; L – lens; OD – oil drop; YS – yolk sac

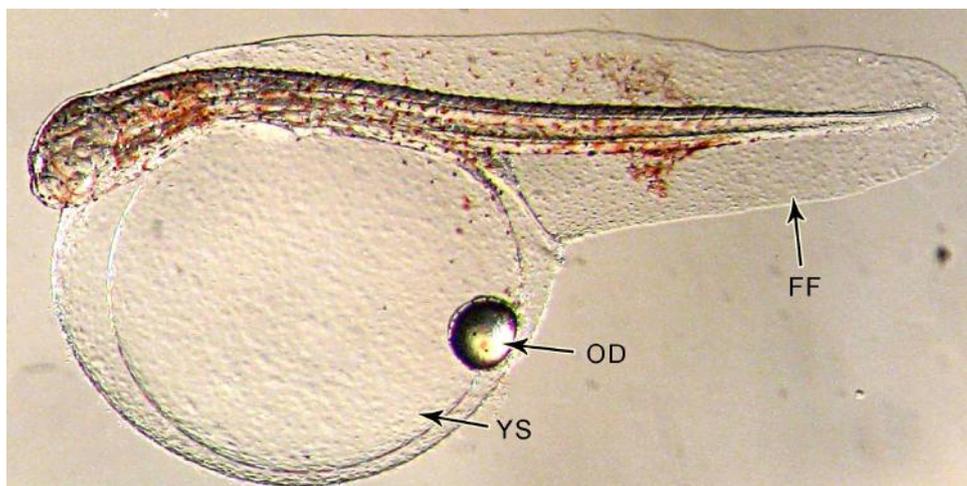


Рис. 18. Личинка калкана через ~ 1,5 часа после выклева. Условные обозначения: YS — желточный мешок; OD — жировая капля; FF — плавниковая кайма

Fig. 18. The Black Sea turbot larvae ~ 1.5 hours after hatching. Symbols: YS – yolk sac; OD – oil drop; FF – fin fold

Заключение. Выполненное нами с помощью современной световой микроскопии исследование закономерностей изменения морфологических структур черноморского калкана в период эмбриогенеза позволило уточнить: некоторые морфологические характеристики разных этапов развития (особенности формирования желточного синцитиального слоя, предшествующего началу эпиболлии, образования зародышевого кольца и дифференциации слоёв бластодермы); хронологию начала сегментации; особенности организации временной структуры Купферова пузырька и его предполагаемой роли в формировании хвостовой почки и в дальнейшем развитии хвостового отдела; особенности развития эмбриональных органов зрения и слуха перед вылуплением предличинки. Приведённая хронологизация последовательности морфологических изменений в единицах относительного времени от общей продолжительности эмбриогенеза позволяет рассчитать длительность каждого этапа при конкретной температуре (в диапазоне оптимальных). Полученные данные могут быть использованы при оценке состояния икры калкана в природных условиях, при работе по усовершенствованию технологии его культивирования и при проведении исследований в области эмбриологии рыб.

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 АААА-А18-118021350003-6).

Благодарности. Авторы признательны за техническую помощь в подготовке иллюстраций к. б. н. И. Е. Драпун (ФИЦ ИнБЮМ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Битюкова Ю. Е. Развитие зрительной рецепции у личинок черноморского калкана *Psetta maeotica* (Pallas) // *Сенсорная физиология рыб* / АН СССР, Отд-е физиологии ; [Кольский филиал АН СССР]. Апатиты, 1984. С. 110–112. [Bityukova Yu. E. Razvitie zritel'noi retseptsii u lichinok chernomorskogo kalkana *Psetta maeotica* (Pallas). *Sensornaya fiziologiya ryb* / AN SSSR, Otd-e fiziologii ; [Kol'skii filial AN SSSR]. Apatity, 1984, pp. 110–112. (in Russ.)]
2. Битюкова Ю. Е., Ткаченко Н. К. Влияние солёности на эмбриональное развитие черноморской камбалы калкана *Psetta maeotica* (Pallas) // *Экология моря*. 1998. Вып. 47. С. 25–28. [Bityukova Yu. E., Tkachenko N. K. Effect of salinity on the embryonic development of Black Sea turbot *Psetta maeotica* (Pallas). *Ekologiya morya*, 1998, iss. 47, pp. 25–28. (in Russ.)]
3. Битюкова Ю. Е., Ткаченко Н. К., Чепурнов А. В. Термочувствительность калкана *Psetta maeotica* (Pallas) (Scophthalmidae) в период эмбрионального развития при искусственном выращивании // *Вопросы ихтиологии*. 1984. Т. 24, вып. 3. С. 459–463. [Bityukova Yu. E., Tkachenko N. K., Chepurnov A. V. Termochuvstvitel'nost' kalkana *Psetta maeotica* (Pallas) (Scophthalmidae) v period embrional'nogo razvitiya pri iskusstvennom vyrashchivani. *Voprosy ikhtiologii*, 1984, vol. 24, iss. 3, pp. 459–463. (in Russ.)]
4. Дехник Т. В. *Ихтиопланктон Чёрного моря*. Киев : Наукова думка, 1973. 235 с. [Dekhnik T. V. *Ikhtioplankton Chernogo morya*. Kiev : Naukova dumka, 1973, 235 p. (in Russ.)]
5. Игнатъев С. М., Мельников В. В., Климова Т. Н., Мельник Л. А., Губанов В. В., Бирюкова М. А. Макро- и ихтиопланктон прибрежных районов Крыма летом 2016 г. // *Системы контроля окружающей среды*. 2017. Вып. 28. С. 93–100. [Ignatiev S. M., Melnikov V. V., Klimova T. N., Melnik L. A., Gubanov V. V., Biryukova M. A. Summer macro- and ichthyoplankton of Crimea coastal areas in 2016. *Sistemy kontrolya okruzhayushchei sredy*, 2017, iss. 28, pp. 93–100. (in Russ.)]
6. Макеева А. П. *Эмбриология рыб*. Москва : Изд-во МГУ, 1992. 246 с. [Makeeva A. P. *Embriologiya ryb*. Moscow : Izd-vo MGU, 1992, 246 p. (in Russ.)]
7. Махотин В. В. Эмбриональное и раннее личиночное развитие беломорской трески *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae) // *Вопросы ихтиологии*. 2016. Т. 56, вып. 2. С. 177–199. [Makhotin V. V. Embryonic and early larval development of White Sea cod *Gadus morhua marisalbi* (Gadidae). *Voprosy ikhtiologii*, 2016, vol. 56, iss. 2, pp. 177–199. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0032945216020119>
8. Попова В. П. Особенности биологии размножения черноморской камбалы-калкана *Scophthalmus maeoticus maeoticus* (Pallas) (наблюдения в море) // *Вопросы ихтиологии*. 1972. Т. 12, вып. 6. С. 1057–1063. [Popova V. P. Biological characteristics of reproductions *Scophthalmus maeoticus* (Pallas) (observation in the sea). *Voprosy ikhtiologii*, 1972, vol. 12, iss. 6, pp. 1057–1063. (in Russ.)]
9. Терещенко В. А., Битюкова Ю. Е., Ткаченко Н. К. Движения зародышей камбалы калкана *Psetta maeotica* и изменения механических свойств оболочки икры в период эмбриогенеза // *Вопросы ихтиологии*. 1992. Т. 32, вып. 6. С. 175–178. [Tereshchenko V. A., Bityukova Yu. E., Tkachenko N. K. Movements of the Black Sea turbot's, *Psetta maeotica*, embryos, and changes of the mechanical characteristics of the egg-membrane during embryogenesis. *Voprosy ikhtiologii*, 1992, vol. 32, iss. 6, pp. 175–178. (in Russ.)]
10. Ханайченко А. Н., Битюкова Ю. Е. Искусственное разведение камбаловых: история вопроса и перспективы их выращивания на Чёрном море // *Рыбное хозяйство Украины*. 1999. Т. 4, вып. 7. С. 15–17. [Khanaichenko A. N., Bityukova Yu. E.

- Iskusstvennoe razvedenie kambalovykh: istoriya voprosa i perspektivy ikh vyrashchivaniya na Chernom more. *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 1999, vol. 4, iss. 7, pp. 15–17. (in Russ.)]
11. Ханайченко А. Н., Светличный Л. С., Гирагосов В. Е., Губарева Е. С. Дыхание икры черноморского калкана (*Scophthalmus maeoticus*) как показатель её развития // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия «Биология»*. 2017. Т. 10, № 1. С. 9–19. [Khanaychenko A. N., Svetlichny L. S., Giragosov V. E., Hubareva E. S. Respiration of the Black Sea turbot (*Scophthalmus maeoticus*) eggs as an indicator of its development. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 9–19. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0004>
 12. Ханайченко А. Н., Гирагосов В. Е., Баяндина Ю. С., Ельников Д. В. Выживаемость и вариабельность аномалий икры черноморского калкана *Psetta maxima maeotica* из нерестового стада юго-западного шельфа Крыма // *Тезисы II Міжнар. іхтіол. наук.-практ. конф.*, Севастополь, 16–19 вересня 2009 р. Севастополь, 2009. С. 156–159. [Khanaychenko A. N., Giragosov V. E., Bayandina Yu. S., El'nikov D. V. Vyzhivaemost' i variabel'nost' anomalii ikry chernomorskogo kalkana *Psetta maxima maeotica* iz nerestovogo stada yugo-zapadnogo shel'fa Kryma. In: *Modern problems of theoretical and practical ichthyology* : proceedings of the 2nd International ichthyological conference, Sevastopol, Sept. 16–19, 2009. Sevastopol, 2009, pp. 156–159. (in Russ.)]
 13. *APROMAR 2018 : La Acuicultura en España* / Asociación Empresarial de Acuicultura de España. Chiclana (Cádiz), 2018, 94 p.
 14. Ballard W. W. Morphogenetic movements and fate map of the cypriniform teleost, *Catostomus commersoni* (Lacepede). *Journal of Experimental Zoology*, 1982, vol. 219, iss. 3, pp. 301–321. <https://doi.org/10.1002/jez.1402190306>
 15. Bian X., Zhang X., Gao T., Wan R., Chen S., Sakurai Y. Morphology of unfertilized mature and fertilized developing marine pelagic eggs in four types of multiple spawning flounders. *Ichthyological Research*, 2010, vol. 57, iss. 4, pp. 343–357. <https://doi.org/10.1007/s10228-010-0167-1>
 16. Carvalho L., Heisenberg C.-P. The yolk syncytial layer in early zebrafish development. *Trends in Cell Biology*, 2010, vol. 20, iss. 10, pp. 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.06.009>
 17. Devauchelle N., Alexandre J. C., Le Corre N., Letty Y. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, 1988, vol. 69, iss. 1–2, pp. 159–184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90194-9)
 18. Doldán M. J., Cid P., Mantilla L., de Miguel Villegas E. Development of the olfactory system in turbot (*Psetta maxima* L.). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2011, vol. 41, iss. 3, pp. 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.01.003>
 19. Essner J. J., Amack J. D., Nyholm M. K., Harris E. B., Yost H. J. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development*, 2005, vol. 132, no. 6, pp. 1247–1260. <https://doi.org/10.1242/dev.01663>
 20. Gibson S., Johnston I. A. Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*, 1995, vol. 124, no. 1, pp. 17–25. <https://doi.org/10.1007/BF00349142>
 21. Kjørsvik E., Pittman K., Pavlov D. From fertilisation to the end of metamorphosis – functional development. In: *Culture of cold-water marine fish* / E. Moksness, E. Kjørsvik, Y. Olsen (Eds). Oxford : Blackwell Publ. Ltd, 2004, pp. 204–278. <http://doi.org/10.1002/9780470995617.ch6>
 22. Kondakova E. A., Efremov V. I. Morphofunctional transformations of the yolk syncytial layer during zebrafish development. *Journal of Morphology*, 2014, vol. 275, iss. 2, pp. 206–216. <https://doi.org/10.1002/jmor.20209>
 23. Polat H., Özen M. R., Keskin S. Y. The embryonic development of Black Sea turbot (*Psetta maxima* Linnaeus, 1758) eggs in different incubation temperatures and salinities. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2018, vol. 18, no. 3, pp. 475–482. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_3_13
 24. Tong S., Xu H., Liu Q. H., Li J., Xiao Z. Z., Ma D. Y. Stages of embryonic development and changes in enzyme activities in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture International*, 2013, vol. 21, iss. 1, pp. 129–142. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9540-6>

**MORPHOLOGICAL FEATURES
OF THE BLACK SEA TURBOT (*SCOPHTHALMUS MAEOTICUS*)
DURING THE PERIOD OF EMBRYONIC DEVELOPMENT**

A. N. Khanaychenko and V. E. Giragosov

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: a.khanaychenko@gmail.com

Black Sea turbot (hereinafter BST), *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814), is a valuable fish for commercial fishery and promising object of industrial mariculture. Potential fecundity of BST is very high, 3–13 million eggs; however, survival of its progenies during early development in the sea is unpredictable and low (mortality is up to 90 %). In nature fertilized pelagic BST eggs rise to the sea surface in 2–3 hours; BST develop in upper waters being part of neuston till hatching. BST on its early stages of development could be considered the most vulnerable as the embryo is exposed to diverse adverse effects. The survival and physiological state of the larvae at hatching till exogenous feeding depend on the norm of morphological characteristics of the embryos during their development. Our aim was to study the norm of the changes in BST morphological characteristics during embryogenesis. Morphological analysis of the BST embryogenesis stages from fertilization till hatching on the basis of detailed study of intact embryos (> 2000 eggs) sampled from different experimental batches incubated under experimental conditions is presented. Digital photos and videos of alive eggs were taken with Canon PowerShot A720 using binocular microscope MBS-10 at magnification 8×4 and under light inverted microscope Nikon Eclipse TS100, equipped with analog camera, at magnification ×4, ×10, and ×40. The morphological features of embryogenesis in BST before and after fertilization, cleavage, blastulation, gastrulation, epiboly, and neurulation and until hatching are presented by photos with detailed description of transforming embryological structures. Fertilized pelagic BST eggs covered by transparent shell vary from (1.26 ± 0.14) to (1.31 ± 0.15) mm in diameter, have homogeneously distributed yolk and a single round transparent oil drop of 0.20–0.21 mm, positioned at the top of the yolk. Scale of timing of morphological changes is presented in relative time units (as a time interval from fertilization until the emergence of morphological structure in percentage of the total duration of embryogenesis, % RT). Cleavage starts at 2.5 % RT. Cell division desynchronizes between the 6th and 7th cleavage, at 128 blastomeres. Yolk syncytial layer controlling processes of epiboly, cells differentiation, and morphogenesis is formed during the 10th–11th mitotic cycle (12 % RT, about 512–1024 cells). From the germ ring registered at 21 % RT, the embryonic shield develops (at 25 % RT), and organize formation of embryonic axis from 20 to 50 % epiboly (31 % RT). During 70–75 % epiboly (40–45 % RT), the neural keel is formed; notochord and optical primordia become visible; Kupffer's vesicle emerges at the start of segmentation. Optic cups develop, and more than 20 somites are observed at the end of epiboly (49 % RT). By 60 % RT the Kupffer's vesicle disappears in tail bud formed; lens placodes are formed in optic cups. Notochord vacuolization, myotomes formation, and tail growth are observed by 65 % RT. The caudal part of the body separates from the yolk by 70–75 % RT. About 80 % RT neuromuscular activity starts; heart beating initiates; free tail covers more than 60 % of the yolk; differentiating xantophores give a pinkish hue to the embryo. By 90–95 % RT eye cups with lenses; three symmetric otic capsules with otoliths, melanophores, and xantophores present in the embryo with 33–38 body somites; it performs jerky movements. Prior hatching, the egg shell becomes elastic, stretches, and breaks in the head area. Hatching occurs 114–94 hours after fertilization at +14...+16 °C. By hatching, all organs are formed in bilateral symmetrical BST larva (standard length is (2.53 ± 0.13) to (2.91 ± 0.10) mm), three auditory chambers with otoliths exist, eyes are non-pigmented, intestinal tract is closed; within 3–5 days it develops at the expense of yolk. Description of morphological changes in the BST embryo at norm of development could be used for elaboration of criteria of developing BST eggs both in natural environment and under cultivation conditions.

Keywords: Black Sea turbot, embryogenesis, morphology, *Scophthalmus maeoticus*