

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛИЧИНОК ЧЕРНОЙ И КОРИЧНЕВОЙ МОРФ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

© 2021 г. Л. Л. Капранова^{1,*}, В. И. Рябушко¹, С. В. Капранов¹, В. Н. Лишаев¹, М. В. Нехорошев¹

¹ ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: lar_sa1980@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2021 г.

После доработки 16.08.2021 г.

Принята к публикации 17.08.2021 г.

В настоящей работе методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой определены концентрации макро- и микроэлементов в гонадах, сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах самцов и самок черной и коричневой морф средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*, собранной в весенний сезон 2019 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинной бухте г. Севастополя (Крым, Черное море). Получены статистически значимые различия в элементном составе гонад, половых продуктов и трохофор различных полов черных и коричневых мидий. В мужских и женских гонадах черных и коричневых мидий отсутствуют достоверные различия в макроэлементном (С, О, N, P, S) составе, тогда как в половых продуктах и личинках различия существенны. Микрофотографии образцов гонад, сперматозоидов, яйцеклеток и личинок черных и коричневых мидий, выполненные с помощью сканирующего электронного микроскопа, отличаются по распределению элементов. В женских гонадах коричневых и черных мидий преобладают медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов достоверно ниже, чем в черных. Содержание цинка и селена в моллюсках черной морфы выше. Больше всего статистически значимых различий в элементном составе удалось выявить в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых мидий.

Ключевые слова: мидия *Mytilus galloprovincialis*, морфы, гонады, сперматозоиды, яйцеклетки, личинки, макроэлементы, микроэлементы, Чёрное море

DOI: 10.31857/S004445292106005X

Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* — важный компонент прибрежных морских экосистем. Он обладает высоким потенциалом поглощения элементов из воды [1], и накопленные в тканях элементы могут превышать их концентрации в окружающей среде на несколько порядков [2]. При накоплении в количествах, превышающих метаболические потребности макро- и микроэлементы могут в конечном итоге выводиться с фекалиями, мочой и половыми продуктами [3, 4]. Поэтому весьма актуально применение мидий в качестве биоиндикаторов состояния прибрежных акваторий.

Элементный состав моллюсков изучают, в основном, в тканях и створках, но мало уделяют внимания определению содержания макро- и микроэлементы в половых продуктах и личинках моллюсков. Макроэлементы включаются в различные биофизические и биохимические процессы и поэтому являются незаменимыми для поддержания жизни. Недостаток даже одного из эссенциальных элементов в организме может остановить его рост

или репродукцию. В организме моллюсков макроэлементы являются структурными компонентами основных органических веществ: белков (С, Н, О, N, S); липидов (С, Н, О, P, N); углеводов (С, Н, О). Макро- и микроэлементы входят в состав биологически активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов, пигментов. Установлена связь концентраций макроэлементов, состоящих из биогенных элементов (С, N, P, S) и основных катионов (Na, Mg, K, Ca), с биоаккумуляцией микроэлементов (Al, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Ba, Pb) в мягких тканях мидий *Mytilus edulis* и *Perna viridis* [5]. Было показано, что концентрации макроэлементов в тканях сильно связаны с ростом и размножением животных, а биологические процессы сильно влияют на биоаккумуляцию некоторых микроэлементов. Биологические факторы, влияющие на накопление макроэлементов, включают в себя возраст, размер, пол, генотип, фенотип, активность питания и степень полового созревания моллюсков [6].

Известно, что в черноморской популяции мидии *M. galloprovincialis* наблюдается полиморфизм по цвету раковины. Увеличение количества мидий с раковиной черного цвета можно рассматривать как физиологический отклик моллюсков на изменения окружающей среды [7]. До сих пор отсутствуют сведения о накоплении макро- и микроэлементов на протяжении всего жизненного цикла мидий, относящихся к разным цветовым морфам, включая их половые продукты и личинки. Изменение элементного состава в процессе нереста черной и коричневой морф мидии также еще не было изучено.

Поэтому целью данной работы является анализ элементного состава мужских и женских гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф мидии *M. galloprovincialis* из Черного моря.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мидии отбирали в весенний сезон 2019 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинной бухте г. Севастополя (44°61'83.46" N, 33°50'33.80" E) при температуре воды в море 8°C на глубине 6 м, визуальную разделяя по цвету створок. Длина раковин черных и коричневых мидий варьировала в диапазоне от 6.5 до 7.5 см. Пол моллюсков и стадию их полового созревания определяли путем изучения мазков гонад под микроскопом [8]. Моллюски находились преимущественно на преднерестовой стадии развития. После механической очистки раковин мидий от обрастаний их тщательно промывали в фильтрованной морской воде и сразу извлекали мягкие ткани, чтобы избежать частичной потери элементов [9]. Выстилающие обе створки гонады мидий отделяли от раковин с использованием пластмассового скальпеля и промокали фильтровальной бумагой, предварительно вымоченной в деионизированной воде и высушенной. Яйцеклетки и сперматозоиды одноразмерных мидий получали по методике, разработанной ранее Л.Л. Никоновой и соавт. [8]. Яйцеклетки собирали с помощью дозатора и переносили в пробирки, сперматозоиды осаждали с помощью центрифуги при 1500 об/мин в течение 5 мин. Для получения личинок в лабораторных условиях проводили нерест и оплодотворение черных и коричневых морф одноразмерных моллюсков по методике, указанной в работе Л.Л. Капрановой и соавт. [10]. Биомассу личинок, полученную на третьи сутки эксперимента, отделяли от воды с помощью фильтра с размером пор 84 мкм. Все подготовленные образцы гонад, половых продуктов и личинок трехкратно промывали деионизированной водой и высушивали до постоянной массы при $105 \pm 5^\circ\text{C}$. Высушенные образцы измельчали в ступке до однородной массы и просеивали через сито.

Качественный анализ для обнаружения макроэлементов проводили с помощью энергодисперсионного рентгеновского анализатора сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) "SU3500" ("Hitachi High-Technologies Corporation", Япония).

Диапазон измерений массовой доли элементов составлял от 0.5% до 100%. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовой доли элементов в диапазонах составляли: от 0.5 до 1.5–20%; от 1.5 до 10–15%; от 10 до 20–10%; от 20 до 100–5%. Количественный анализ микроэлементов проводили на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой ("Plasma Quant MS Elite", "Analytik Jena", Германия), с параметрами, приведенными в работе [9]. Перед микроэлементным анализом лабораторную посуду выдерживали в течение двух суток в 2% растворе азотной кислоты, очищенной перегонкой без кипения в установке "DST-1000" ("Saville", США), с последующим ополаскиванием деионизированной водой. Биологические пробы минерализовали путем мокрого сжигания в очищенной 65% азотной кислоте во фторопластовых пробирках и затем разбавляли деионизированной водой так, чтобы разбавление было в пределах 1000–2000 мл г⁻¹ (в пересчете на сухую массу). Калибровочные кривые строили по стандартным растворам, полученным путем разбавления деионизированной водой многоэлементного стандарта "IV-ICPMS-71A-C" ("Inorganic Ventures", США, 10 мг л⁻¹). Коэффициенты детерминации линейной регрессии для всех калибровочных графиков были не менее 0.998.

Биологическая повторность (количество вариантов одного и того же опыта) – пятикратная. Аналитическая (количество анализов, взятых с одного образца) – трехкратная. Всего было проанализировано 150 образцов мидий: 5 мужских и 5 женских гонад черной и коричневой морфы, половые продукты, полученные от 5 самок и 5 самцов черных и коричневых мидий, а также их личинки. Погрешность трехкратных измерений макро- и микроэлементов в каждом образце не превышала допустимых значений. Статистические различия оценивали в программе PAST 4.01, применяя однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный попарный анализ по критерию Тьюки. Различия между средними значениями в выборках считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты представлены как среднее \pm доверительный интервал с вероятностью 95% ($n = 15$, где n – количество измерений).

Работа выполнена с соблюдением биоэтических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях, с участием мидий, соответствовали этическим стандартам и утвержденным правовыми актами РФ, а также принципам Базельской декларации.

Таблица 1. Макроэлементный состав и значимые различия ($p < 0.05$, $n = 15$) в элементном составе (С, О, N, P, S) черной и коричневой морф мидии *Mytilus galloprovincialis*

Элементы	Гонады ♂		Гонады ♀		Сперматозоиды		Яйцеклетки		Трохофоры	
	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.
	Массовая доля, %									
С	55.7 ± 2	52 ± 0.6	65.5 ± 5.7	59.5 ± 4.9	57.7 ± 1.0	57.1 ± 6.3	77.5 ± 1.0*	55.7 ± 1.4*	58.1 ± 6.6*	81.4 ± 0.4*
О	24.0 ± 0.3	25 ± 0.6	20.1 ± 3.7	22.8 ± 3.2	19.7 ± 1.6	16.8 ± 1.5	12.9 ± 1.4*	24.1 ± 0.2*	22.4 ± 3.5*	2.5 ± 0.1*
N	10.0 ± 2	13 ± 0.6	5.4 ± 1.7	8.7 ± 2.5	11.4 ± 0.1*	3.0 ± 1.2*	1.8 ± 0.8*	11.1 ± 1.0*	9.9 ± 3.2*	<0.1*
P	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.5	4.6 ± 0.6*	<0.1*	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 2.5	<0.1
S	1.5 ± 0.4	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.1*	3.1 ± 2.3*	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1

Примечание: кор. – коричневая морфа раковины мидии; чер. – черная морфа раковины мидии; ± – доверительный интервал с вероятностью 95% ($n = 15$); * – достоверные различия между морфами ($p < 0,05$, $n = 15$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим элементный состав коричневой и черной морфы мидии. Для сравнения макроэлементного состава коричневой и черной морфы мидии выбраны мужские и женские гонады, находящиеся на пятой стадии полового созревания (до нереста), сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры. Полученные экспериментальным путем данные пересчитывали на массу органического вещества, состоящего из углерода, кислорода, азота, фосфора и серы (табл. 1). Так как водород не имеет характеристических пиков в рентгеновском спектре, то рассчитывали теоретически возможное минимальное и максимальное содержание водорода в белках, липидах и углеводах (в виде гликогена) мягких тканей мидий. Полученное значение составило от 6.06 до 6.56% и учтено в табл. 1. Статистический анализ показал значимые различия в содержании С, О, N, P, S в сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах коричневых и черных мидий (в табл. 1 обозначены звездочкой). Следует отметить, что спектры СЭМ отображают элементный состав поверхностного слоя исследуемых образцов толщиной несколько микрон.

Углерод. Различий в содержании углерода в гонадах черных и коричневых мидий не обнаружено. При этом в мужских гонадах черных мидий углерода на 10% меньше, чем в женских гонадах коричневых мидий. В сперматозоидах коричневой и черной морф количество углерода одинаковое ($58.0 \pm 0.5\%$ и $57 \pm 3\%$), но наблюдаются статистически значимые различия по N, P и S. В яйцеклетках коричневой морфы содержание углерода на 20% выше, чем в черной, что, вероятно, связано с более высоким содержанием жирных кислот в половых продуктах коричневых мидий (табл. 1) [11]. В личинках черных мидий содержание углерода на 30% выше, чем в личинках коричневых моллюсков.

Кислород. Количество кислорода в мужских и женских гонадах и сперматозоидах черных и ко-

ричевых мидий примерно одинаковое. Так как в яйцеклетках коричневых мидий содержание липидов выше из-за более высокого содержания жирных кислот, то массовая доля кислорода – в два раза ниже, чем в черных, у которых, видимо, более высокое содержание углеводов. В трохофорах коричневых мидий, наоборот, кислорода на порядок больше, чем в черных личинках.

Азот. В мужских гонадах черных и коричневых мидий содержание азота в два раза больше, чем в женских, что указывает на большее содержание в липидах женских гонад насыщенных жирных кислот [11]. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий количество азота на порядок больше, чем в черных. В яйцеклетках наоборот. Повышенное содержание азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий можно объяснить различием в количестве белков в половых продуктах черной и коричневой морф.

Фосфор. Гонады самцов мидий имеют более высокое содержание фосфора по сравнению с самками. Вероятно, данная особенность может быть связана с повышенной концентрацией фосфатных эфиров, в первую очередь АТФ, который служит основным источником энергии для обеспечения подвижности сперматозоидов. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора больше, чем в черных. В яйцеклетках наоборот. Видимо, в сперме коричневых и в яйцеклетках черных мидий также больше АТФ, что можно объяснить разной интенсивностью работы ферментов.

Серя. В сперматозоидах черных мидий содержание серы в несколько раз больше, чем в коричневых. Вероятно, это связано с повышенным количеством серосодержащих аминокислот в моллюсках (цистеина, метионина, цистина). В трохофорах коричневых и черных мидий значимых различий в содержании S не найдено. Обнаружено, что у двустворок *M. edulis* и *Rangia cuneata* метионин может преобразовываться в цистеин и окисляться до продуктов, дающих начало синтезу таурина, но с принципиальными отличиями [12, 13]. Одно из них за-

ключается в механизме окисления цистеина в таурин. У *R. cuneata* наблюдали большое количество меченой цистеиновой кислоты, образующейся при окислении цистеина, что указывало на дальнейшее окисление цистеинсульфиновой кислоты в цистеиновую кислоту, в результате декарбоксилирования которой образуется таурин. У *M. edulis* цистеиновая кислота не образовалась, зато появился меченный промежуточный продукт — гипотаурин. Таурин образовывался и оставался в тканях мидии, в то время как у *R. cuneata* таурин в течение нескольких часов исчезал из организма. Концентрацию аминокислот в организме связывают с соленостью воды. При сравнении содержания аминокислот в двух видах морских моллюсков *M. edulis* и *Ostrea edulis* с пресноводным видом *Anodonta cygnea* оказалось, что пресноводный вид имеет более низкие концентрации аминокислот, чем морские моллюски [14]. Аналогичные результаты получены при сравнении концентрации аминокислот в тканях пресноводных и морских ракообразных. Различия двух морф мидии по элементному составу также можно объяснить адаптацией моллюсков к условиям обитания [15].

Рассмотрим распределение элементов в половых продуктах и трохофорах мидии, полученное с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (рис. 1). Для наглядности на рис. 1 *a–j* представлены наиболее подходящие масштабы сканирования.

Цвета клеток и тканей черных и коричневых морф мидии имеют разнообразный характерный морфотип, образующий яркие орнаменты. Цветные узоры тканей мужских и женских гонад, половых продуктов и личинок черных и коричневых моллюсков отличаются по секторам различной ширины, концентрических полос, пятен, шевронов или зигзагообразных сложных мозаик, состоящих из геометрических фигур разных размеров. Во-первых, это может быть связано с различной структурой тканей. Во-вторых, особенно отличаются по цвету и структуре сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры мидий, принадлежащие к разным цветовым морфам.

Красным цветом на зеленом фоне обозначены зоны с максимальным содержанием кислорода. Возможно, это вызвано тем, что содержание гликогена и сахаров в мужских гонадах коричневых и черных мидий различное. Представленные изображения отличаются текстурой поверхности. Образцы, относящиеся к черной морфе, более текстурированы. На всех изображениях отчетливо видны оттенки от бледно-зеленого (рис. 1*d*) до темно-фиолетового (рис. 1*i*) и изумрудного (рис. 1*j*) цвета, что показывает различия в элементном составе гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф. Отмечены фиолетовые включения различного размера в трохофорах мидий (рис. 1 *i, j*).

Эти включения можно наблюдать на зеленом фоне (рис. 1*a–h*). Вероятно, это факт свидетельствует об ответной реакции трохофор на влияние экзогенных факторов, например, солености, температуру [16] или загрязнения водной среды [10].

У трохофор черных мидий фиолетовым цветом обозначены атомы серы (рис. 1*j*). Массовая доля серы в трохофорах коричневых мидий на порядок больше, чем в черных: $1.1 \pm 0.1\%$ и $0.1 \pm 0.1\%$ соответственно.

Различия двух морф мидий по элементному составу обусловлены биохимическими характеристиками их тканей [17]. Активности альдолазы в жабрах темно-коричневых мидий ниже, чем у черных мидий [18], что связано с особенностями условий обитания мидий.

Цветовые морфы характерны и для других видов морских моллюсков. Так, при изучении размерно-возрастных и фенотипических особенностей соматического роста черноморского гребешка выделено 7 цветовых морф [19]. Бежевый, фиолетовый и серо-коричневый фенотипы имеют высокий уровень синтеза белка. Моллюски, относящиеся к фенотипу смешанного типа, имели показатели тканевого биосинтеза примерно в 2.5 раза ниже, чем представители других морф. Полученные результаты свидетельствуют о сопряженности ростовых процессов с окрасом раковин моллюска. Окраска раковины мидий зависит от гемэритрина — фиолетового пигмента, что непосредственно связано с экспрессией определенных генов [7]. Так, при изучении цвета раковин устриц *Crassostrea gigas* впервые обнаружили эндогенные порфирины, определяющие пигментацию раковин [16]. Наличие гемов, чьими предшественниками являются порфирины, объясняло пурпурный цвет раковин, а также темный цвет мышц моллюсков. Эти исследования показали, что различный окрас раковин устриц связан с трансляцией генов, так как у некоторых моллюсков обнаружены псевдогены или неактивные гены, которые не могли приводить к экспрессии определенного белка.

Мидии накапливают металлы из воды независимо от того, являются ли эти элементы незаменимыми для их жизнедеятельности или ксенобиотиками. Поэтому представляет интерес изучить микроэлементный состав гонад, половых продуктов и трохофор мидий, относящихся к разным цветовым морфам (табл. 2).

Гонады самок отличаются от гонад самцов повышенным содержанием As, Mn и Zn на разных стадиях полового созревания (за исключением стадии 4). Это дает сильный довод в пользу биохимической вовлеченности этих элементов в оогенез мидий.

Особое внимание следует уделить элементам, которые играют существенную функциональную роль в гаметогенезе мидий. Например, селен и

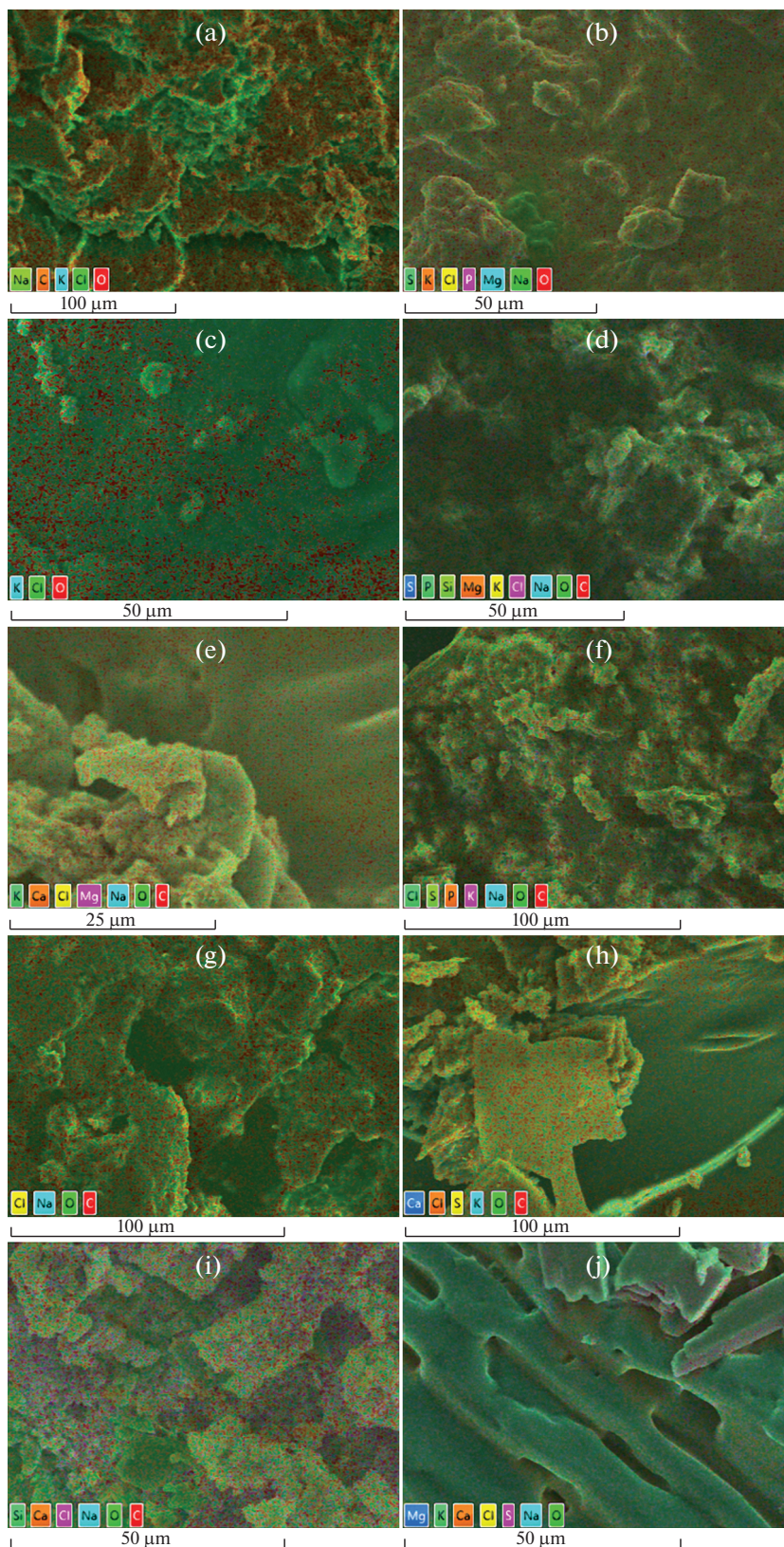


Рис. 1. Микрофотографии в СЭМ половых продуктов и трохофор мидии *Mytilus galloprovincialis*: а – гонады ♂ коричневой морфы, б – гонады ♂ черной морфы, с – гонады ♀ коричневой морфы, д – гонады ♀ черной морфы, е – сперматозоиды коричневой морфы, ф – сперматозоиды черной морфы, г – яйцеклетки коричневой морфы, h – яйцеклетки черной морфы, и – трохофоры коричневой морфы, j – трохофоры черной морфы.

Таблица 2. Концентрация некоторых микроэлементов в черных и коричневых морфах мидии *Mytilus galloprovincialis*

Объект	Концентрация микроэлементов, мкг/г _{сух.}																	
	Cu		As		Fe		Al		Mg		Ca		Si		Se		Zn	
	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.	Кор.	Чер.
Г♂	80 ± 9	95 ± 12	7.0 ± 0.4*	15 ± 3*	65 ± 8	55 ± 4	50 ± 3*	30 ± 2*	757 ± 230*	450 ± 30*	115 ± 26	71 ± 12	30 ± 10	22 ± 5	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	17 ± 3	20 ± 1
Г♀	347 ± 65*	173 ± 14*	14 ± 1	18 ± 5	117 ± 33	145 ± 24	73 ± 13	84 ± 13	398 ± 54*	207 ± 46*	91 ± 25	53 ± 18	46 ± 12	42 ± 9	2.0 ± 0.4*	0.7 ± 0.1*	57 ± 8	51 ± 10
Сп.	764 ± 99*	2139 ± 256*	29 ± 5*	3 ± 1*	189 ± 20*	232 ± 16*	253 ± 13*	473 ± 13*	171 ± 28*	1292 ± 136*	363 ± 65*	233 ± 48*	95 ± 15	110 ± 30	2.0 ± 0.1*	0.6 ± 0.1*	28 ± 1*	62 ± 12*
Я	373 ± 89*	213 ± 13*	12 ± 3	17 ± 3	83 ± 16	52 ± 11	137 ± 24*	63 ± 9*	141 ± 19	163 ± 37	139 ± 12*	94 ± 13*	63 ± 2	44 ± 6	0.5 ± 0.1*	1.0 ± 0.1*	45 ± 2	56 ± 10
Т	613 ± 14*	439 ± 42*	н.о.	0.3 ± 0.2	49 ± 2*	75 ± 11*	103 ± 2	106 ± 12	45 ± 11*	109 ± 9*	93 ± 2*	239 ± 17*	26 ± 9	28 ± 5	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.1*	5.0 ± 0.1*

Примечание: Данные представлены как среднее ± доверительный интервал с вероятностью 95%, $n = 15$; н.о. – не обнаружено; кор. – коричневая морфа раковины мидии; чер. – черная морфа раковины мидии; Г♂ – мужские гонады; Г♀ – женские гонады; Сп. – сперматозоиды; Я – яйцеклетки; Т – трохофоры; * – достоверные различия между морфами ($p < 0.05$, $n = 15$).

цинк необходимы для поддержания функций репродуктивной системы. Цинк, полученный из пищи, связан, в основном, с мягкими тканями мидий, а Zn из морской воды – с раковинами [20]. В общем, не менее 30% микроэлементов поглощается с пищей, а в случае Se эта доля составляет 98% [21].

Различия в распределении Se между органами, а также его влияние на репродуктивную функцию моллюсков плохо изучены. Концентрации Se в гонадах и половых продуктах самок и самцов мидий изменяются аналогично концентрациям стероидных гормонов и зависят от репродуктивного цикла моллюсков [9, 10].

Данные о роли Se в метаболизме мидий, к сожалению, отсутствуют. Селен и селенопротеины обеспечивают жизнеспособность сперматозоидов и защиту организма от активных форм кислорода. Исследования селенопротеинов на генном уровне показали, что их отсутствие во время сперматогенеза приводит к аномальному развитию сперматозоидов, что, в свою очередь, влияет на качество спермы [22]. Селен в основном влияет на репродуктивные параметры и плодовитость животных [23]. Существуют доказательства того, что размер моллюсков может играть роль в поглощении Se. Обнаружено, что концентрация селена в моллюсках *S. amurensis*, подвергшихся воздействию растворенных источников Se (IV), снизилась на 50%, когда средняя длина раковины моллюсков увеличилась на 30% [24].

Цинк важен для всех форм жизни. Особенно много его в тканях морских животных. Известна специфическая функция цинка в репродуктивной системе амфибий, например, существование “цинковых искр”, контролирующих оплодотворе-

ние [25]. Цинк является кофактором большой группы ферментов, катализирующих гидролиз пептидов, белков и сложных эфиров, полимеризацию ДНК и РНК. Наличие цинка стимулирует рост и деление клеток [26].

Настоящее исследование показало, что в гонадах и личинках черной морфы мидии содержание Zn больше, чем в коричневых моллюсках. Также наблюдается отличие концентраций Zn в аналогичных тканях самцов и самок. Но только по этим данным нельзя установить, с какими субклеточными структурами или биохимическими процессами связаны более высокие концентрации элементов. Наиболее явные отличия в содержании Zn можно наблюдать в сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах. В мужских и женских гонадах содержание Zn примерно одинаковое. Видимо, мидии поглощают микроэлементы, в том числе Zn, из окружающей среды, где они, подобно стероидным гормонам, депонируются в мягких тканях, а затем экскретируются вместе с половыми продуктами [4, 23].

Содержание Se в женских гонадах и сперматозоидах коричневых мидий в два раза выше, чем в черных моллюсках. А в яйцеклетках и трохофорах – наоборот. Можно предположить, что различия в содержании Se и Zn в мягких тканях и половых продуктах черных и коричневых мидий влияют на биохимический состав как самих моллюсков, так и их половых продуктов и личинок. В целом многие элементы накапливаются в больших количествах в гонадах самок, что согласуется с измерениями в мягких тканях в преднерестовый период [9]. Это дает сильный довод в пользу биохимической вовлеченности этих элементов в оогенез мидий. Несмотря на то что пока не известна специфическая

функция этих элементов в репродуктивной системе самок мидий, имеются сообщения об эссенциальности цинка в развитии ооцитов и эмбрионов.

Можно предположить, что максимальную концентрацию микроэлементов в гонадах мидии можно наблюдать на преднерестовой стадии полового созревания, когда масса гонад максимальна. Тем не менее, как показали результаты наших исследований, содержание Mg и Ca выше в мужских гонадах. В мужских и женских гонадах коричневых мидий Mg и Ca выше, чем у черных (табл. 2).

В женских гонадах коричневых и черных мидий, в отличие от мужских, преобладают Cu, Fe и As, но в гонадах коричневых моллюсков содержание этих элементов ниже, чем в черных (табл. 2). Наиболее важными факторами снижения концентрации элементов в тканях является перераспределение элементов по всему организму в процессе интенсивного роста гонад и выведение с половыми продуктами [4, 9].

Содержание K и Na в данной работе не рассматривали, так как морская вода, в которой выращивали личинок, является “матрицей” для этих элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно отметить, что при оценке содержания металлов в тканях мидий следует учитывать пол моллюсков, их возраст и репродуктивный цикл, который оказывает влияние на межсезонные изменения массы ткани и цвет раковин. В мужских и женских гонадах черных и коричневых мидий не наблюдали достоверных различий в макроэлементном составе, тогда как в половых продуктах и личинках различия были существенные. В гонадах, половых продуктах коричневых мидий содержание углерода, следовательно, содержание органических соединений выше, чем в черных мидиях.

В яйцеклетках коричневой морфы кислорода в два раза меньше, а в трохофорах на порядок больше, чем в моллюсках, относящихся к черной морфе. Это показывает, что в трохофорах коричневых мидий содержится большое количество полисахаридов и/или других энергетических доноров и гликогена. Десятикратное превышение азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий, по сравнению с черными, в основном указывает на различный аминокислотный состав моллюсков, что может быть связано как с условиями их обитания, так и заложено генетически. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора, и соответственно АТФ, больше, чем в черных моллюсках. В яйцеклетках наоборот.

В сперматозоидах черных мидий содержание серы в пять раз выше, чем в коричневых, вероятно, из-за наличия серосодержащих аминокислот. В

мужских и женских гонадах коричневых мидий концентрация марганца, кальция, калия и фосфора выше, чем у черных. В женских гонадах коричневых и черных мидий преобладают медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов ниже, чем в черных. Больше всего статистически значимых различий удалось выявить в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых мидий, что при дальнейшем развитии может отражаться на биохимическом составе моллюсков.

Вероятно, в процессе биохимической эволюции в организмах возникали разнообразные металлопротеины, и эта диверсификация требовала не только химической вариативности элементов, но и их относительно высоких концентраций в тканях. Этот факт, скорее всего, указывает на то, что мидии двух морф могут развиваться с разной интенсивностью.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” по темам “Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия” (№ 121040500247-0) и “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” (№ 121030300149-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (М.В.Н., Л.Л.К., В.И.Р.), планирование эксперимента, подготовка и обработка проб, сбор данных (Л.Л.К., С.В.К., В.И.Р., В.Н.Л.), обработка данных (Л.Л.К., В.И.Р.), написание и редактирование манускрипта (Л.Л.К., В.И.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rainbow P.S.* (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120 (3): 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)
2. *Casas S., Gonzalez J.L., Andral B., Cossa D.* (2008) Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*): impact of physiology. *Environmental Toxicology and Chemistry (ET&C)* 27 (7): 1543–1552. <https://doi.org/10.1897/07-418>

3. Varotto L., Domeneghetti S., Rosani U., Manfrin C., Cajaraville M.P., Raccanelli S., Pallavicini A., Venier P. (2013) DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). PLOS One 8 (1): e54602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054602>
4. Bezuidenhout J., Dames N., Botha A., Frontasyeva M.V., Goryainova Z.I., Pavlov D. (2015) Trace elements in mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South African West coast. Ecological Chemistry and Engineering Society 22 (4): 489–498.
<https://doi.org/10.1515/eces-2015-0028>
5. Fengjie Liu, Wen-Xiong Wang (2015) Linking trace element variations with macronutrients and major cations in marine mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis*. Environmental Toxicology and Chemistry 34 (9): 2041–2050.
<https://doi.org/10.1002/etc.3027>
6. Richir J., Gobert S. (2014) The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. Ecological Indicators 36: 33–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.021>
7. Chelyadina N.S. (2018) Phenotypic and sexual structure of *Mytilus galloprovincialis* Lam., cultivated on the mussel-oyster farm in the outer harbor of Sevastopol city (Crimea, Black Sea). Marine Biological Journal 3 (3): 86–93.
<https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.3.09>
8. Nikonova L.L., Nekhoroshev M.V., Ryabushko V.I. (2017) Total testosterone and estradiol in the gonads and gametes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 53 (6): 519–522.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017060114>
9. Kapranov S.V., Karavantseva N.V., Bobko N.I., Ryabushko V.I., Kapranova L.L. (2021) Sex- and sexual maturation-related aspects of the element accumulation in soft tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. collected off coasts of Sevastopol (southwestern Crimea, Black Sea). Environmental Science and Pollution Research 28 (17): 21553–21576.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-12024-z>
10. Kapranova L.L., Malakhova L.V., Nekhoroshev M., Lobko V.V., Ryabushko V.I. (2020) Fatty acid composition in trochophores of mussel *Mytilus galloprovincialis* grown under contamination with polychlorinated biphenyls. Marine Biological Journal 5 (2): 38–49.
<https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.04>
11. Kapranova L.L., Nekhoroshev M.V., Malakhova L.V., Ryabushko V.I., Kapranov S.V., Kuznetsova T.V. (2019) Fatty acid composition of gonads and gametes in the black sea bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. at different stages of sexual maturation. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 55 (6): 448–455.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060024>
12. Welborn J.R., Manahan D.T. (1995) Taurine metabolism in larvae of marine molluscs (Bivalvia, Gastropoda). Journal of Experimental Biology 198:1791–1799.
13. Allen K., Awapara J. (1960) Metabolism of sulfur amino acids in *Mytilus edulis* and *Rangia cuneata*. Biology Bulletin 118: 173–182.
14. Duchâteau G., Sarlet H., Camien M.N., Florkin M. (1952) Acides amines non protéiniques des tissus chez les Mollusques Lamellibranches et chez les Vers. Comparaison des formes marines et des formes dulcicoles. Archives Internationales de Physiologie 60 (1): 124–125.
<https://doi.org/10.3109/13813455209145044>
15. Slynko Yu.V., Kulikova A.D., Slynko E., Soldatov A.A. (2018) Genetic changeability by loci COI mtDNA for different coloring of shell phenotypes of black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Russian Journal of Genetics 54 (8): 944–949.
<https://doi.org/10.1134/S1022795418080112>
16. Bonnard M., Cantel S., Boury B., Parrot I. (2020) Chemical evidence of rare porphyrins in purple shells of *Crasostrea gigas* oyster. Scientific Reports 10:12150.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69133-5>
17. Kulikova A.D., Soldatov A.A., Andreenko T.I. (2015) The activity of transaminases in the tissues of the Black-Sea mollusk *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 51 (1): 23–31.
<https://doi.org/10.1134/S0022093015010044>
18. Kulikova A.D., Andreenko T.I., Soldatov A.A. (2015) Activity of aldolase in tissues of *Mytilus galloprovincialis* with different shells color. Hydrobiological Journal 51 (6): 53–59.
<https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v51.i6>
19. Shcherban S.A., Melnik A.V. (2020) Size and Age Characteristics and Phenotypic Peculiarities of Somatic Growth of the Black Sea Mollusk *Flexopecten glaber ponticus* (Bivalvia, Pectinidae). Biology Bulletin 47 (8): 920–929.
<https://doi.org/10.1134/S1062359020080129>
20. Fisher N.S., Teyssié J.L., Fowler S.W., Wang W.X. (1996) Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions. Environmental Science & Technology (ES&T) 30 (11): 3232–3242.
<https://doi.org/10.1021/es960009u>
21. Wang W.-X., Fisher N.S. (1997) Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series 161: 103–115.
<https://doi.org/10.3354/meps161103>
22. Ahsan U., Kamran Z., Raza I., Ahmad S., Babar W., Riaz M.H., Iqbal Z. (2014) Role of selenium in male reproduction – A review. Animal Reproduction Science 146 (1–2): 55–62.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>
23. Mehdi Y., Hornick J.-L., Istasse L., Dufrasne I. (2013) Selenium in the environment, metabolism and involvement in body function. Molecules 18: 3292–3311.
<https://doi.org/10.3390/molecules18033292>

24. Lee B.G., Lee J.S., Luoma S.N. (2006) Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: a bioenergetic modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5: 1933–1940.
<https://doi.org/10.1897/05-540R.1>
25. Seeler J.F., Ajay S., Zaluzec N.J., Bleher R., Lai B., Schultz E.G., Hoffman B.M., LaBonne C., Woodruff T.K., O'Halloran T.V. (2021) Metal ion fluxes controlling amphibian fertilization. *Nature Chemistry* 13: 683–691.
<https://doi.org/10.1038/s41557-021-00705-2>
26. Keith A.M., Huang C.-C., Carol A. (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *The Journal of Nutrition* 130 (5): 1437S–1446S.
<https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1437S>

ELEMENTAL COMPOSITION OF GONADS, GAMETES AND LARVAE IN THE BLACK AND BROWN MORPHS OF THE BIVALVE MOLLUSK *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

L. L. Kapranova^{a, #}, V. I. Ryabushko^a, S. V. Kapranov^a,
V. N. Lishaev^a, and M. V. Nekhoroshev^a

^a A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

[#] e-mail: lar_sa1980@mail.ru

Concentrations of the bulk and trace elements were determined in male and female gonads, gametes (sperm and eggs), and larvae (trochophores) of black and brown morphs of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* using energy dispersive X-ray spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. The mollusks were collected in spring 2019 on a mussel-and-oyster farm (Black Sea, Crimea, Sevastopol, Karantinnaya Bay). In the male and female gonads of black and brown morphs, no statistically significant differences were detected in concentrations of the bulk structural elements (C, N, O, P, S), while in gametes and trochophores, these differences were significant. Trace elemental analysis revealed that in the female gonads of both black and brown morphs, Cu, Fe, and As were dominant, however in brown morphs, concentrations of these elements were significantly lower than in black mussels. Zn and Se concentrations in the gonads of black morphs were significantly higher than in brown mussels. Most of the statistically significant differences were found between trochophores and eggs of black vs. brown morphs. These data show that the two *M. galloprovincialis* morphs differ in their elemental composition.

Keywords: mussel *Mytilus galloprovincialis*, morphs, gonads, sperm, eggs, larvae, trace elements, bulk structural elements, Black Sea