

Спикульный комплекс трех видов голожаберных моллюсков семейства Onchidorididae (Gastropoda: Doridina) Белого моря

Е.Д. Никитенко, Е.В. Ворцепнева

Кафедра зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д.1, стр.10, Москва 119234, Россия.

E-mail: nikitenkocatia@yandex.ru, vortsepneva@gmail.com

РЕЗЮМЕ: Впервые для трех видов семейства Onchidorididae — *Acanthodoris pilosa* (Abildgaard in Müller, 1789), *Adalaria proxima* (Alder et Hancock, 1854), *Onchidoris muricata* (Müller, 1776), обитающих в Белом море, был описан спикульный состав с выделением преобладающего типа спикул в конкретных участках тела, внутренняя морфология спикул, а также их взаимное расположение и способ упаковки. Отмечено наличие одноосных, дуосных, трехосных, четырехосных спикул, а также сферических спикул, встречающихся только в папиллах *Acanthodoris pilosa*. Методом сканирующей электронной микроскопии изучена внешняя и внутренняя морфология спикул. Для исследуемых видов характерны три типа внутренней организации спикул: монолитная, смешанная, концентрическая. Установлено отсутствие корреляции между формой спикул и их внутренним строением. В работе рассмотрены особенности взаимного расположения спикул относительно друг друга, описаны тракты, в которые организованы спикулы. Впервые отмечена корреляция между толщиной покровов и толщиной спикульных трактов: плотность покровов зависит не от количества спикул, а от характера их локализации друг относительно друга (увеличение плотности упаковки спикул за счет сложной организации четырехосных спикул и уменьшения общей толщины стенки тела) и толщины слоя, в котором они располагаются. Поскольку организация спикул может существенно отличаться даже у близких родов, то разное строение спикульного комплекса можно объяснить разницей в биологии и экологии видов.

Как цитировать эту статью: Nikitenko E.D., Vortsepneva E.V. 2020. Spicule complex of three Onchidorididae species (Gastropoda: Doridina) from the White Sea // *Invert. Zool.* Vol.17. No.1. P.44–58. doi: 10.15298/invertzool.17.1.05

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спикулы, *Acanthodoris*, *Adalaria*, *Onchidoris*, Nudibranchia, Mollusca.

Spicule complex of three Onchidorididae species (Gastropoda: Doridina) from the White Sea

E.D. Nikitenko, E.V. Vortsepneva

Invertebrate Zoology Department, Moscow State University, Leninskie gory 1-10, Moscow 119234, Russia. E-mail: nikitenkocatia@yandex.ru, vortsepneva@gmail.com

ABSTRACT: Onchidorididae (Doridina, Nudibranchia) is a family of nudibranch mollusks that contain spicules in their integuments that perform supporting and protective functions.

Despite the fact that the presence of spicules for dorids has been noted for a long time, data on the morphology of spicules, the features of their relative positioning and localization in the body is presented only for some species of mollusks. For the first time for three species of the family Onchidorididae — *Acanthodoris pilosa* (Abildgaard in Müller, 1789), *Adalaria proxima* (Alder et Hancock, 1854), *Onchidoris muricata* (Müller, 1776) that inhabit the White Sea. In each body parts the prevailing type of spicules was detected, the internal morphology of spicules as well as their relative position and packing method were studied. The presence of monoactine, diactine, triactine, and tetractine spicules, was noted as well as spherical spicules, found only in *Ac. pilosa* papillae was noted. The external and internal morphology was studied using scanning electron microscopy. Three types of internal organization of spicules were distinguished - monolithic, mixed, concentric. Absence of correlation between the type of spicules and their internal structure has been established. The paper considers the features of the localization of spicules relative to each other, describes specific tracts into which the spicules are organized. For the first time, a correlation between the thickness of the integument and the thickness of the spicular tracts was noted: the density of the covers depends not on the number of spicules, but on the nature of their localization relative to each other (an increase in packing density of spicules due to the complex organization of tetractine spicules and a decrease in the total thickness of the body wall) and on the thickness of the layer that they are located in. Since the organization of spicules can significantly differ even in closely related genuses, the different structure of the spicule complex can be explained by the difference in the biology and ecology of the species.

How to cite this article: Nikitenko E.D., Vortsepneva E.V. 2020. Spicule complex of three Onchidorididae species (Gastropoda: Doridina) from the White Sea // Invert.Zool. Vol.17. No.1. P.44–58. doi: 10.15298/invertzool.17.1.05

KEY WORDS: spicule, *Acanthodoris*, *Adalaria*, *Onchidoris*, Nudibranchia, Mollusca.

Введение

Голожаберные моллюски — широко распространенный отряд брюхоногих моллюсков (Nudibranchia, Gastropoda) (Wägele *et al.*, 2014), насчитывающий около 4700 видов по всему миру (Dean, Prinsep, 2017). В состав Nudibranchia входят два больших подотряда: Cladobranchia и Doridina (Pola, Gosliner, 2010). Одной из характерных черт Nudibranchia является отсутствие раковины — важнейшего признака большинства Mollusca. Вместо раковины у голожаберных моллюсков могут формироваться различные структуры, которые частично берут на себя опорную и защитную функции. Все представители Nudibranchia могут выделять защитные химические вещества поверхностью тела (Dean, Prinsep, 2017). В группе Cladobranchia защитную функцию могут брать на себя кни-

досаки, расположенные на вершинах папилл, содержащие в себе стрекательные капсулы Cnidaria (Goodheart, Bely, 2017), а для большинства Doridina характерны субэпидермальные спикулы, состоящие из аморфного карбоната кальция с примесями ватерита, брусита и флуорита (Odum, 1955; Kress, 1981; Potts, 1981; Foale, Willian, 1987; Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995). Подотряд Doridina включает более двух тысяч видов, в т.ч. представителей семейства Onchidorididae, характерными особенностями которых являются наличие буккальной помпы и не полностью сформированный жаберный карман (Hallas *et al.*, 2015).

Первые упоминания о спикулах в покровах дорид встречаются более ста лет назад (Lankester, 1883). Наиболее подробные исследования были проведены в конце прошлого века (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1993, 1995),

и даже предпринимались попытки использовать спикулы как дополнительный морфологический признак при построении филогении (Penney, 2008). Несмотря на это, для большинства дорид, кроме факта наличия спикул в покровах, нет больше никаких данных. Данные по спикулогенезу малочисленны, формирование спикул происходит в мантии на стадии велигера (Tompson, 1969) и при метаморфозе (Rose, 1983). Форма спикул описана для немногих видов (около пятнадцати), в основном по тотальным препаратам покровов и выделенным отдельным спикулам без детализации расположения спикул в теле (Kress, 1981; Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995; Sanchez-Tocino *et al.*, 2014). На основании этих данных можно отметить несколько типов спикул (одноосные, двуосные, трехосные, четырехосные, а также редко встречающиеся типы, например, сферические, h-образные, v-образные) (Kress, 1981; Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995; Alba-Tercedor *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013; Sanchez-Tocino *et al.*, 2014). Также на основании изучения сломов отдельных выделенных спикул пяти видов моллюсков описано четыре типа внутренней морфологии спикул (полые, монолитные, с концентрическими слоями, а также с концентрическими и радиальными слоями одновременно) (Foale, William, 1987; Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995). Более подробно, в том числе с помощью методов компьютерной томографии, изучено взаимное расположение спикул в покровах моллюсков без описания внешней и внутренней морфологии отдельных спикул (Penney, 2006, 2008, 2018; Alba-Tercedor *et al.*, 2011, Kasamesiri *et al.*, 2011; Sanchez-Tocino *et al.*, 2014). Описано два основных тракта: горизонтальный и вертикальный (Penney, 2006). Горизонтальный тракт подразделяется на горизонтальный тракт нотума (краевая и центральная часть) и горизонтальный тракт ноги (Penney, 2008, 2018; Kasamesiri, 2011). Краевой участок горизонтального тракта нотума подразделяется на три основных подтипа: дендритный (разветвленный), паутинообразный, решетчатый. Центральная часть нотума может

быть похожа на краевую часть — состоять из строго упорядоченных спикул, либо центральная часть может отличаться — спикулы могут быть крупнее, но представлены реже, либо спикулы могут отсутствовать. Горизонтальный тракт ноги имеет схожее строение с горизонтальным трактом нотума. Вертикальный тракт подразделяется на тракт непосредственно в папиллах, а также у их основания (Penney, 2008, 2018; Kasamesiri, 2011). Вертикальный тракт, локализованный в папиллах, образован спикулами, собранными в виде розетки или в виде кольца, у некоторых видов может отсутствовать.

Спикулы несут две основные функции: опорную и защитную. С одной стороны, спикулы уменьшают энергетическую ценность голожаберных моллюсков, делая их менее привлекательными для хищников, и способствуют мимикрии под других животных, например, губок (Sanchez-Tocino *et al.*, 2014), выполняя тем самым защитную функцию. А с другой, несут опорную функцию, являясь поддерживающей арматурой, формообразующим «скелетом» моллюсков (Penney, 2006; Ehrlich, 2010).

Данная работа посвящена первому комплексному исследованию спикульных трактов, которое включает как данные о внешней и внутренней морфологии спикул, так и способах упаковки спикул в различных компартментах тела для трех представителей группы Onchidorididae. Подобный подход обеспечивает не только понимание строения отдельных частей спикульного комплекса, но и его функционирования как единого целого.

Объектами исследования были выбраны три вида дорид, обитающих в Белом море: *Acanthodoris pilosa* (Abildgaard in Müller, 1789), *Adalaria proxima* (Alder et Hancock, 1854), *Onchidoris muricata* (Müller, 1776). *Acanthodoris pilosa* — амфибореальный вид, максимальные размеры которого 30 мм, местообитания приурочены к наличию мшанки *Flustrellidra hispida* (Fabricius, 1780). *Adalaria proxima* и *Onchidoris muricata* — виды со схожей экологией. Максимальные разме-

ры тела *A. proxima* — до 20 мм, *O. muricata* — до 12 мм. Обитают на колониях мшанок *Electra pilosa* (Linnaeus, 1767) и рода *Membranipora* (de Blainville, 1830) (Millen, 1987).

Материал и методы

Объектом исследования были выбраны широко распространенные в Белом море представители голожаберных моллюсков — *Acanthodoris pilosa*, *Adalaria proxima*, *Onchidoris muricata*. Сбор материала производился водолазами с глубины 12–15 м, а также вручную на литорали в окрестностях беломорской биологической станции МГУ имени Н.А. Перцова (ББС МГУ) в 2016–2018 гг.

Всего было собрано 2 особи *Ac. pilosa*, 18 особей *Ad. proxima*, 67 особей *O. muricata*. Для любых манипуляций все объекты ослабляли в растворе 4% $MgCl_2$ от 4 ч до суток (в зависимости от размера особи).

Для изучения отдельных спикул разные участки ноги, нотума и папилл у 2 особей *Ac. pilosa*, 7 особей *Ad. proxima*, 10 особей *O. muricata* помещали в раствор белизны (10%-ный раствор $NaOCl$) при комнатной температуре до полного растворения мягких тканей (в течение 10–15 мин). Далее спикулы отмывали дистиллированной водой. Полученные тотальные препараты были изучены с помощью светового микроскопа Leica DM 2500.

Для исследования фрагментов тела были сделаны поперечные срезы с помощью скальпелей и лезвий. Для фотографирования участков тела использован стереомикроскоп Leica CLS 150X.

Методами световой и электронной микроскопии были изучены 2 особи *Ac. pilosa*, 14 особей *Ad. proxima*, 53 особи *O. muricata*.

Для изучения методом сканирующей электронной микроскопии особи после ослабления фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом на 0,1 М PBS (натрий-фосфатный буфер) или PB Millonig's (натрий-фосфатный буфер Милонига) (Millonig, 1964) в течение 1 ч при температуре +4 °С. Затем раствор сменяли на аналогичный, в котором фиксация продолжалась еще один час. Да-

лее объект отмывали в соответствующем буфере 3 раза по 30 мин, после чего дегидратировали в этиловом спирте восходящей концентрации (10, 30, 50, 70%). На каждом этапе раствор сменяли дважды каждые 20 мин. После проводка осуществлялась аналогично в смесях спирта и ацетона с соотношениями 3:1, 1:1, 1:3 соответственно. Затем объект переводили в чистый ацетон, после чего высушивали в критической точке.

Высушенные объекты с помощью пинцетов и препаровальных игл были разделены на фрагменты нотума, ноги и папилл. Внутреннее строение спикул было изучено на сломах с помощью сканирующих электронных микроскопов JEOL JSM-6380L (JEOL, США), CamScan S2 (Cambridge Instrument Scientific Company, Великобритания), Hitachi S405A (Hitachi, Япония). Всего было просмотрено более 60 сломов.

Для определения преобладающего типа спикул с помощью лезвий и скальпелей вырезали участок нотума, ноги, папилл, после чего производили растворение белизной и подсчет разных типов спикул. Спикулы были разделены по типам, подсчитаны и измерены. Измерение длины спикул проводили по главной оси.

Специальные термины, используемые в статье

Единой признанной терминологии организации спикул голожаберных моллюсков на русском языке не существует, поэтому предложены следующие термины, близкие к оригинальным:

Спикульный комплекс (spicule network)

В данной работе не применяется прямой перевод «спикульные сети». Термин «комплекс» является обобщающим и включает в себя как спикульные «сети», встречающиеся в ноге и нотуме, так и вертикально-ориентированные спикулы в папиллах. Вместо термина «спикульные сети» используется термин «спикульные тракты». Спикульный тракт — совокупность спикул одинаково ориентированных на определенном участке тела.

Папилла (*papillae* и *tubercle*)

В настоящей работе используется термин «папилла», выбранный как перевод оригинальных терминов «*papillae*» и «*tubercle*». Папилла — вырост нотума.

Звездчатый тракт (*tubercle base network*)

Оригинальный термин «*tubercle base network*» — спикульная сеть в основании папилл (Penney, 2006) — выделен нами в отдельный тип тракта и назван «звездчатый тракт». Несмотря на локализацию у основания папиллы и функцию поддержания папиллы, которую так же выполняет вертикальный тракт, звездчатый тракт имеет принципиально иное строение. Он состоит из радиально расходящихся спикул под основанием папиллы, является переходным звеном между горизонтальным трактом нотума и папиллой.

Результаты

Форма спикул

Для *Acanthodoris pilosa* характерны преимущественно одноосные спикулы длиной от 100 до 450 мкм (рис. 5). Большая часть одноосных спикул не прямолинейная, а имеет изгиб чаще всего в центральной части спикулы, реже смещен к ее концу (таб. 1). Помимо одноосных спикул редко встречаются двуосные, трехосные и четырехосные, а также уникальный для изучаемых нами видов сферический тип спикул. Спикулы данного типа располагаются вдоль стенок папилл (таб. 1).

Спикульный комплекс *Adalaria proxima* включает одноосные, двуосные, трехосные и четырехосные спикулы (таб. 1). Некоторые одноосные спикулы несут на поверхно-

Таблица 1. Внешняя и внутренняя морфология спикул *Acanthodoris pilosa*, *Adalaria proxima*, *Onchidoris muricata*.

Table 1. External and internal morphology of the spicules of *Acanthodoris pilosa*, *Adalaria proxima*, *Onchidoris muricata*.

	monoactine	multiactine	specialized	structure
<i>Acanthodoris pilosa</i>		 diactine  triactine	 spherules	 mo
<i>Adalaria proxima</i>		 diactine  triactine  tetractine	 H-shaped	 mo  mx  c
<i>Onchidoris muricata</i>		 diactine  triactine  tetractine	NO	 mo  mx  c

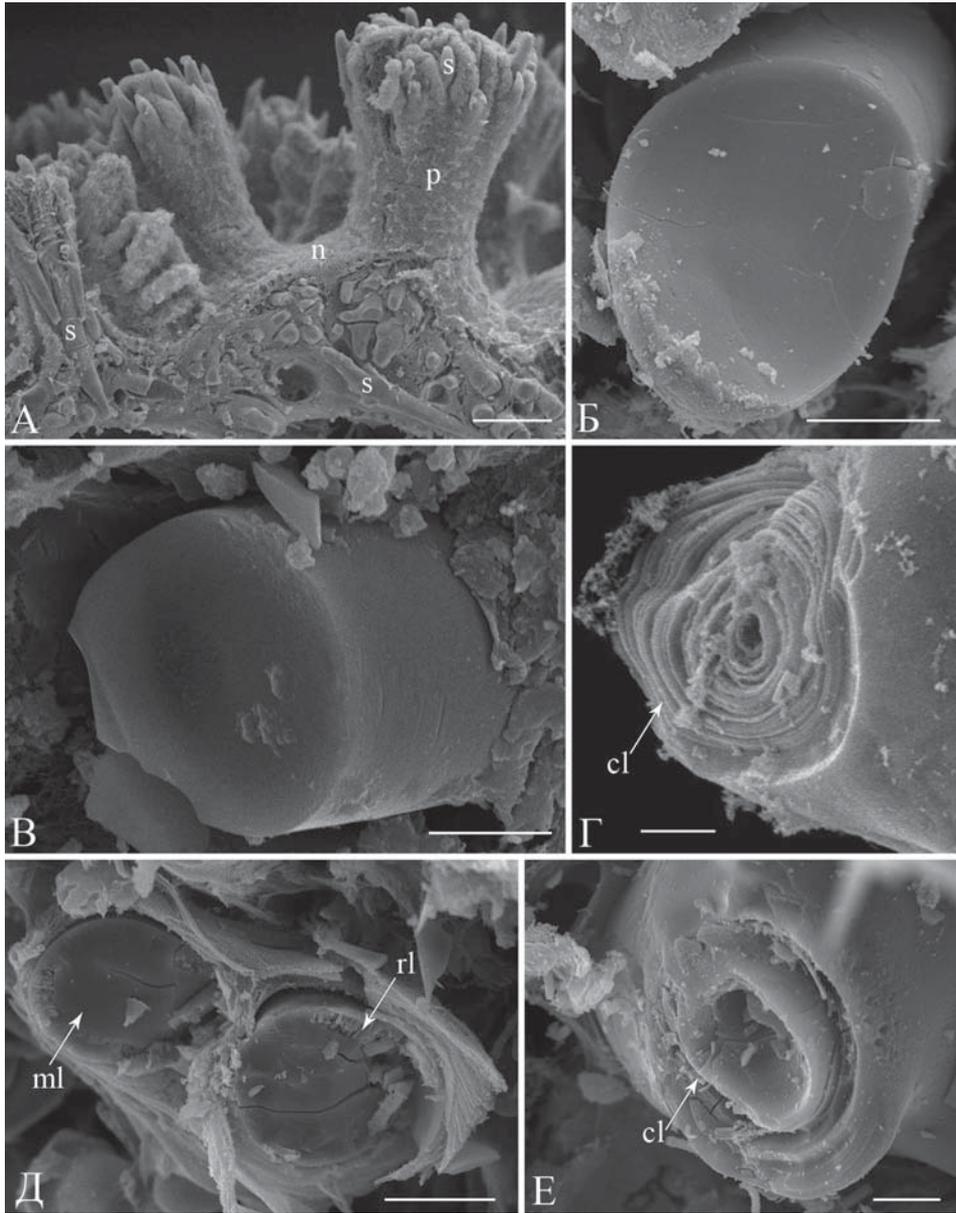


Рис. 1. Внутренняя морфология спикул на срезе (СЭМ). А — локализация спикул (s) *Onchidoris muricata* на поперечном срезе через середину тела; Б — монолитная спикула *Acanthodoris pilosa*; В — монолитная спикула *O. muricata*; Г — спикула с концентрическими слоями (cl) *O. muricata*; Д — смешанная структура с монолитным центральным слоем (ml) и радиально-исчерченным периферическим слоем (rl) *O. muricata*; Е — спикула с концентрическими слоями *Adalaria proxima*. Масштаб: А — 20 мкм; Б — 30 мкм; В — 5 мкм; Г — 1 мкм; Д, Е — 10 мкм.

Fig. 1. Internal morphology of the spicules (SEM). А — transversal section through the middle region of the body of *Onchidoris muricata*; Б — monolithic type of spicules (s) of *Acanthodoris pilosa*; В — monolithic type of spicules of *O. muricata*; Г — spicules type with concentric layers (cl) of *O. muricata*; Д — mixed spicules type with monolithic middle part (ml) and radially-spaced peripheral layer (rl) of *O. muricata*; Е — spicules type with concentric layers of *Adalaria proxima*. Scale bar: А — 20 μm ; Б — 30 μm ; В — 5 μm ; Г — 1 μm ; Д, Е — 10 μm .

сти небольшие бугорки, функция которых не ясна, а некоторые спикулы изогнуты (таб. 1). Сферические спикулы отсутствуют, однако встречаются единичные экземпляры спикул специфичной h-образной формы (таб. 1). Линейный размер спикул от 20 до 200 мкм. Преобладают одноосные и четырехосные спикулы, двуосные и трехосные встречаются реже (рис. 5).

У *Onchidoris muricata* встречаются одноосные, в т.ч. изогнутые, двуосные, трехосные и четырехосные спикулы (таб. 1), сферические спикулы отсутствуют. Линейный размер спикул от 20 до 170 мкм. Преобладающий тип спикул — четырехосный.

Внутренняя морфология спикул

Для описания внутренней структуры всего было изучено более 60 словов. Согласно просмотренному материалу можно достоверно отметить 3 типа внутренней организации спикул, встречающихся в теле (рис. 1А): 1) монолитный тип (рис. 1Б, В), для которого характерна однородная внутренняя структура; 2) смешанный тип (рис. 1Д): на сломе спикул этого типа можно различить 2 слоя — внутренний монолитный стержень (30 мкм в диаметре) и наружный слой с радиальной исчерченностью (3–4 мкм толщиной), который может занимать как весь периметр края, так и его часть; 3) концентрический тип (рис. 1Г, Е): на сломе спикулы имеют концентрические слои, расположенные очень плотно друг к другу, толщина слоев составляет 0,16 мкм у *Onchidoris muricata* и 5 мкм у *Adalaria proxima*.

Для *Acanthodoris pilosa* характерны однородные монолитные спикулы, в то время как *Ad. proxima* и *O. muricata* имеют спикулы со всеми типами внутренней структуры (монолитные, смешанные и концентрические).

Общая морфология спикульных трактов

Ниже приводится описание особенностей строения горизонтальных трактов ноги и нотума, вертикального и звездчатого трактов у изученных видов.

Acanthodoris pilosa

Толщина покровов *Ac. pilosa* достигает 0,1 мм (в нотуме без учета папилл) у максимально крупной пойманной особи, длина которой 2,3 см, ширина центральной части нотума 1,1 см (рис. 2).

Горизонтальный тракт нотума (рис. 2А) развит неравномерно: спикулы отсутствуют в центральной части нотума, наибольшего развития тракт достигает в краевых участках тела (рис. 2Е). В формировании принимают участие одноосные прямые и одноосные спикулы с изгибом в центральной части (рис. 2Ж). Толщина покровов нотума примерно в два раза превышает толщину слоя спикул.

Горизонтальный тракт ноги (рис. 2А, 3): расположение спикул такое же, как в горизонтальном тракте нотума. Однако в центральной части тракта имеются спикулы, рыхло расположенные друг относительно друга, в краевых зонах спикулы располагаются в несколько слоев, формируя плотное скопление (рис. 23). Горизонтальный тракт ноги сложен преимущественно изогнутыми одноосными спикулами (рис. 2И). Толщина покровов ноги превышает толщину слоя спикул в четыре раза.

Вертикальный тракт отсутствует. В папиллах обнаружены сферические спикулы диаметром до 10 мкм (рис. 2Г, Д). Такие спикулы располагаются вдоль стенки папилл, но не формируют плотного скопления.

Звездчатый тракт: спикулы расположены радиально (рис. 2Б, В) у основания папиллы. Звездчатые тракты находятся на значительном расстоянии друг от друга и не пересекаются между собой, плотной спикульной сети не формируется (рис. 2Б, В).

Onchidoris muricata

Толщина покровов *O. muricata* не превышает 0,02 мм (без учета папилл) при максимальной длине особи 10–12 мм (рис. 3).

Горизонтальный тракт нотума (рис. 3А) сформирован плотными скоплениями спикул. В центральной части нотума спикулы формируют сеть, в краевой зоне спикулы лежат параллельно друг другу, но перпендикулярно к оси тела. На всем протяжении

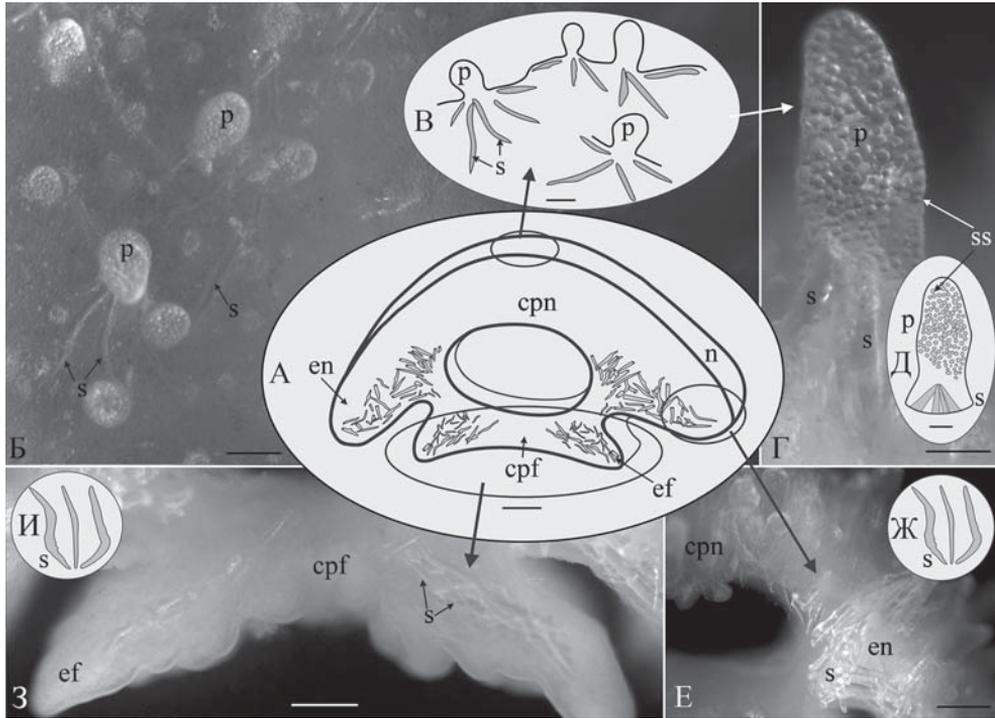


Рис. 2. Организация спикульного комплекса *Acanthodoris pilosa* в середине тела (световая микроскопия). А — схема строения горизонтальных трактов ноги и нотума. Спикулы (s) плотно расположены в краевых зонах и отсутствуют в центральной части тела (cpn); Б — нотум со звездчатыми трактами вид с дорсальной стороны, световая микроскопия; В — схема взаимного расположения звездчатых трактов относительно друг друга; Г — папилла (p) без вертикального тракта, вид сбоку, световая микроскопия; Д — схема строения папиллы со сферическими спикулами (ss), не формирующими плотного скопления и краями спикул звездчатого тракта в основании; Е — поперечный срез через краевой участок нотума (en) с плотным скоплением спикул; Ж — схема спикул горизонтального тракта нотума (n); З — поперечный срез через горизонтальный тракт ноги с плотным скоплением спикул в краевой части (ef) и отсутствием спикул в центральной части ноги (cpf); И — схема спикул горизонтального тракта ноги. Масштаб: А — 250 мкм; Б, В — 200 мкм; Г, Д — 100 мкм; Е — 200 мкм. Fig. 2. General morphology of the spicules complex of *Acanthodoris pilosa* in the middle region of the body (light microscopy). А — scheme of the horizontal tracts of the notum and foot. The spicules (s) are densely located in the marginal zones and absent in the central part of the notum (cpn); Б — view on the notum and stellate tract, from above (light microscopy); В — scheme of colocalization of the stellate tracts; Г — general view of the papilla (p) without vertical tract, lateral view, light microscopy; Д — scheme of the papilla with the widely located spherical spicules (ss) and parts of the stellate tracts; Е — transversal section through the edge of the notum (en) with dense packed spicules; Ж — scheme of the horizontal tract in the notum (n); З — transversal section through the horizontal tract of the foot with dense packed spicules in the edge (ef) and central part of the foot (cpf) free of spicules (cpf); И — scheme of the spicule arrangement in the horizontal tract of the foot. Scale bar: А — 250 μm ; Б, В — 200 μm ; Г, Д — 100 μm ; Е — 200 μm .

тракта спикулы расположены плотно (рис. 3Ж). Краевые зоны нотума несут преимущественно четырехосные спикулы. Наличие коротких вторичных осей позволяет спикулам формировать плотно упакованный уча-

сток, спикулы расположены бок обок друг к другу, вторичные оси располагаются одна под другой (рис. 33). В нотуме встречаются спикулы всех типов, преобладают четырехосные спикулы (рис. 3Б).

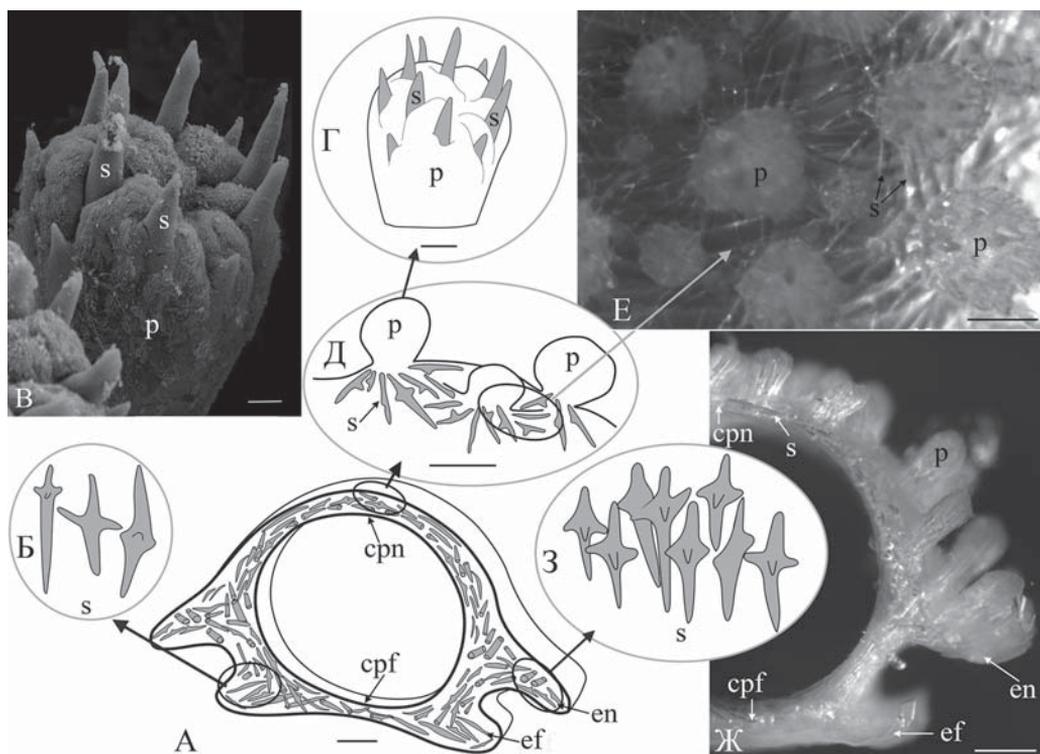


Рис. 3. Организация спикульного комплекса *Onchidoris muricata* в середине тела. А — схема строения горизонтальных трактов тела, спикулы расположены равномерно; Б — внешняя морфология преобладающих типов спикул; В–Г — внешний вид папиллы (р) с выступающими субэпидермальными спикулами (s), входящими в состав вертикального тракта (СЭМ, схема); Д, Е — взаимное расположение спикул, входящих в состав звездчатого тракта (вид на нотум (п) с дорсальной стороны); Ж — поперечный срез тела с равномерно плотно расположенными спикулами во всем теле; З — схема расположения четырехосных спикул в краевой части нотума (en) по принципу «ключ–замок».

Обозначения: cpn — центральная часть нотума; cpf — центральная часть ноги; ef — периферическая часть ноги. Масштаб: А — 100 мкм; В — 50 мкм; Г, Д, Е — 100 мкм; Ж — 200 мкм.

Fig. 3. General morphology of the spicules complex of *Onchidoris muricata* in the middle region of the body (light microscopy). А — scheme of the horizontal tracts of the notum and foot. The spicules (s) are densely located in the body; Б — external morphology of prevailing types of spicules; В–Г — general view of the papilla (p) with vertical tract. Spicules are visible outside the papilla; Д, Е — photo on the light microscopy with the notum and stellar tract, view from above; Ж — transversal section through the body with dense packed spicules; З — scheme of the tetractine spicules arrangement in the edge of notum.

Abbreviations: cpn — central part of the notum; cpf — central part of the foot; ef — the edge of the foot. Scale bar: А — 100 μ m; В — 50 μ m; Г, Д, Е — 100 μ m; Ж — 200 μ m.

Горизонтальный тракт ноги сформирован преимущественно четырехосными (рис. 3Б) спикулами, расположенными слоями. Толщина спикульного слоя примерно в 3 раза превосходит толщину покровов.

Вертикальный тракт в папиллах (рис. 3В, Г) сложен преимущественно четырехосными спикулами, которые формируют розетку.

Верхний слой спикул расположен прямо под покровным эпителием, у *O. muricata* спикулы выступают за пределы папиллы примерно на 50–100 мкм (рис. 3В, Г).

Звездчатый тракт *O. muricata* состоит из спикул, расположенных в базальной части папиллы, где спикулы расходятся радиально от основания, соседние тракты пересекаются

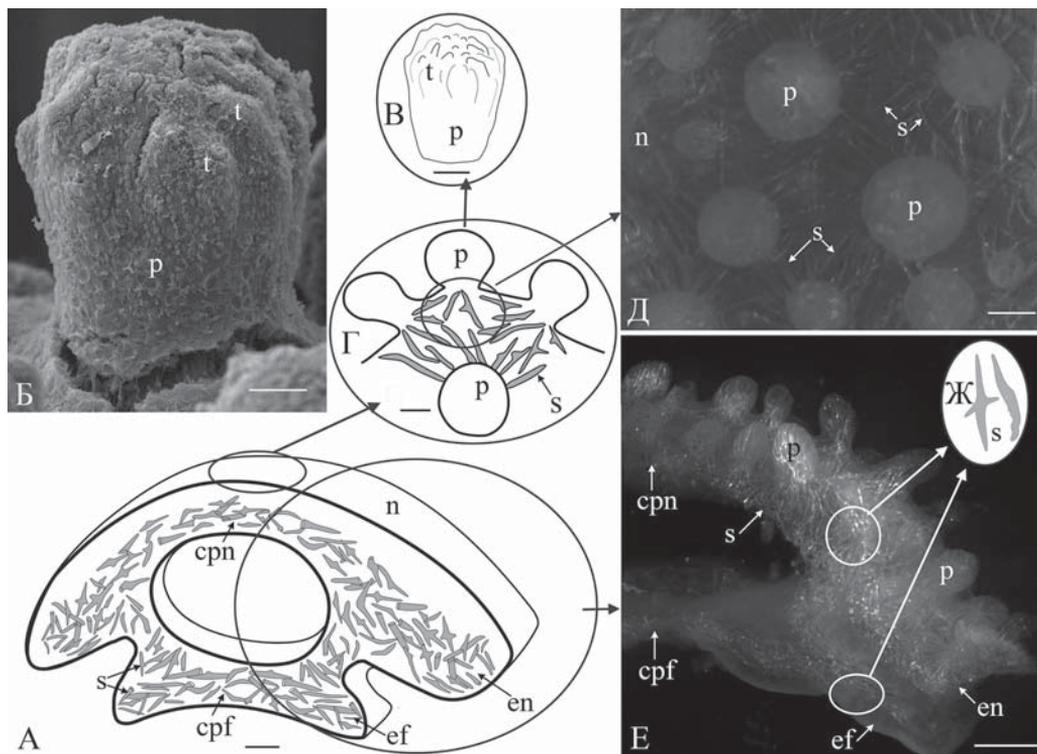


Рис. 4. Организация спикульного комплекса *Adalaria proxima* в середине тела. А — схема строения горизонтальных трактов тела, поперечный срез; Б, В — внешний вид папиллы (p) с бугорками (t) с подлежащими спикулами (СЭМ, схема); Г, Д — взаимное расположение спикул звездчатых трактов относительно друг друга, вид с дорсальной стороны (световая микроскопия, схема); Е — поперечный срез тела с равномерно расположенными спикулами (s) на всем протяжении горизонтального тракта ноги и нотума (n) (световая микроскопия); Ж — внешняя морфология преобладающих типов спикул в горизонтальном и вертикальном тракте.

Обозначения: cпн — центральная часть нотума; cпф — центральная часть ноги; en — периферическая часть нотума; ef — периферическая часть ноги. Масштаб: А, Б — 200 мкм; В — 150 мкм; Г — 100 мкм; Д — 200 мкм; Е — 500 мкм.

Fig. 4. General morphology of the spicules complex of *Adalaria proxima* in the middle region of the body (light microscopy). А — scheme of the horizontal tracts of the notum and foot; Б, В — general view of the papilla (p) with tubercles from spicules (SEM, scheme); Г, Д — scheme of the spicules arrangement in stellar tracts, view from above, light microscopy; Е — transversal section through the body with dense packed spicules in horizontal tract in body, light microscopy; Ж — external morphology of prevailing types of spicules in horizontal and vertical tracts.

Abbreviations: cпн — central part of the notum; cпф — central part of the foot; en — the edge of the notum; ef — the edge of the foot. Scale bar: А, Б — 200 μ m; В — 150 μ m; Г — 100 μ m; Д — 200 μ m; Е — 500 μ m.

между собой, формируя плотную сеть (рис. 3Д, Е). В формировании тракта участвуют преимущественно четырехосные спикулы.

Adalaria proxima

Толщина покровов *Ad. proxima* не превышает 0,02 мм (без учета папилл) при длине особи 10–12 мм (рис. 4).

Горизонтальный тракт нотума (рис. 4А, Е) сложен преимущественно одноосными бугристыми спикулами, а также трех- и четырехосными спикулами (рис. 4Ж).

При изучении поперечных срезов туловища через различные участки тела было выяснено, что спикулы располагаются с оди-

наковой плотностью в несколько слоев на протяжении всего тракта. У края нотума спикулы лежат параллельно друг другу, но перпендикулярно краю тела. Плотность расположения спикул одинакова в краевом и центральном участке тракта (рис. 4Е). Толщина стенки нотума меньше толщины слоя спикул примерно в 3 раза.

Строение горизонтального тракта ноги (рис. 4А, Е) аналогично строению горизонтального тракта нотума, за исключением того, что в ноге нет плотного скопления по краю, и спикулы расположены равномерно.

Вертикальный тракт в папиллах (рис. 4Б, В) представлен перпендикулярно ориентированными относительно оси тела спикулами. В папилле расположены преимущественно четырехосные спикулы, которые ориентированы в виде розетки. Верхний слой спикул расположен прямо под покровным эпителием, визуалью за пределы папиллы спикулы не выступают (рис. 4Б, В).

Звездчатый тракт: спикулы расположены радиально у основания папилл (рис. 4Г, Д), в переходной зоне между горизонтальным и вертикальным трактами. Соседние звездчатые тракты располагаются близко друг к другу, так, что происходит их пересечение, формируется плотная спикульная сеть (рис. 4Г, Д). В формировании трактов принимают участие спикулы, имеющие вторичные оси, преимущественно двухосные, четырехосные.

Обсуждение

Морфология спикульного комплекса

В результате наших исследований впервые были подробно описаны спикульные комплексы для трех видов семейства Onchi-

dorididae *Acanthodoris pilosa*, *Adalaria proxima*, *Onchidoris muricata*, включая внешнюю и внутреннюю морфологию отдельных спикул и их организацию в тракты.

Горизонтальный тракт можно разделить на тракт краевой и центральной части нотума. На основании изучения спикульных трактов 16 видов моллюсков Пенни (Penney, 2008) выделил три основных типа краевых участков горизонтальных трактов: паутинообразный, дендритный (разветвленный) и решетчатый типы. Согласно нашим данным, эта классификация не является универсальной для всех моллюсков, и с исследованными видами дорид соотносится только отчасти.

Решетчатый тип горизонтального тракта края нотума согласно Пенни (Penney, 2008) характеризуется спикулами, расположенными параллельно и перпендикулярно краю. Для исследуемых видов *Ad. proxima* и *Ac. pilosa* можно отметить сходства с этим типом организации. У *Ac. pilosa* край нотума сложен одноосными спикулами, плотно прилегающими друг к другу, как в решетчатом типе, однако спикулы, расположенные параллельно краю, отсутствуют. У *Ad. proxima* край нотума содержит радиально ориентированные одноосные и четырехосные спикулы, плотно прилегающие друг к другу, аналогично решетчатому типу. Спикулы, расположенные параллельно краю, в отличие от решетчатого типа, единичны и не формируют плотного скопления.

Дендритный тип горизонтального тракта края нотума, согласно Пенни (Penney, 2008), характеризуется основной осью, состоящей из плотно расположенных спикул, ориентированных перпендикулярно к краю, от которой отходят более мелкие отдельные тяжи спикул под углом к краю. Тракт края нотума дендритного типа *O. muricata* сложен пре-

Fig. 5. External morphology of the prevailing types of spicules of *Acanthodoris pilosa*: А — monoactine straight (ms) and monoactine curved spicules (mcs); Б — spherical spicules (ss); common spicules types of *Onchidoris muricata*: В — monoactine, triactine (trs), tetractine spicules (ts); Г — diactine (ds), triactine, tetractine, specialized h-shaped spicules (hss); common spicules types of *Adalaria proxima*: Д — monoactine spicule with tubercles (t); Е — diactine spicule; Ж — triactine spicule; З, И — monoactine curved spicule, monoactine spicule with tubercles, tetractine spicules. А–Г — light microscopy; Д–И — SEM. Scale bar: А — 100 μm ; Б — 2,5 μm ; В, Г, Д — 50 μm ; Е — 15 μm ; Ж — 25 μm ; З, И — 20 μm .

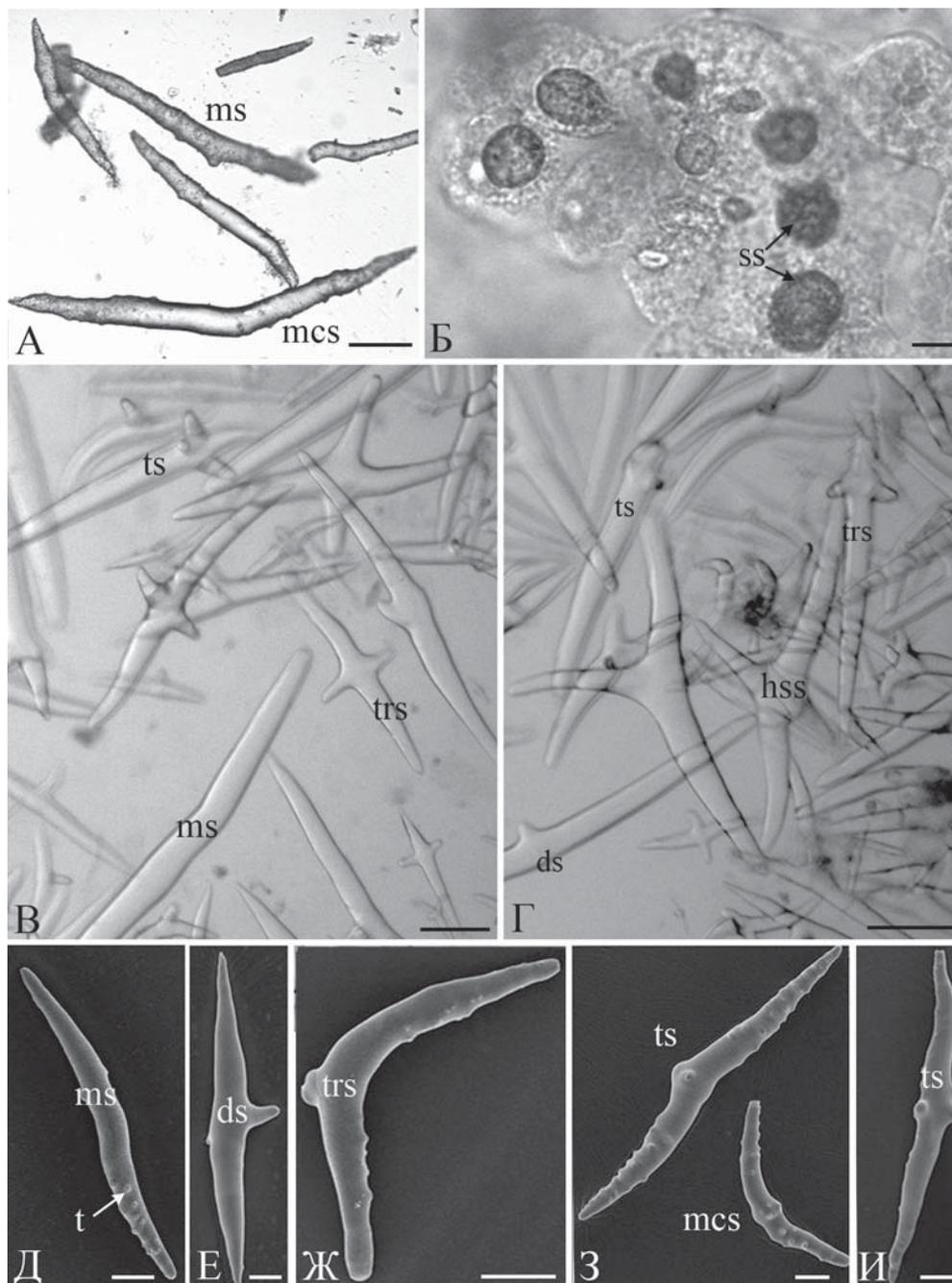


Рис.5. Преобладающие типы спикул, внешняя морфология. *Acanthodoris pilosa*: А — одноосные прямые (ms) и изогнутые спикулы (mcs); Б — сферические спикулы (ss); *Onchidoris muricata*: В — одноосные, трехосные (trs), четырехосные спикулы (ts); Г — двухосные (ds), трехосные, четырехосные, специфические h-образные спикулы (hss); *Adalaria proxima*: Д — одноосная спикула с бугорками (t); Е — двуосная спикула; Ж — трехосная спикула; З, И — одноосная изогнутая спикула с бугорками, четырехосная спикула. А–Г — световая микроскопия; Д–И — СЭМ. Масштаб: А — 100 мкм; Б — 2,5 мкм; В, Г, Д — 50 мкм; Е — 15 мкм; Ж — 25 мкм; З, И — 20 мкм.

имущественно четырехосными спикулами, что позволяет формировать наиболее плотные скопления за счет стыковки вторичными осями спикул.

Центральная часть нотума может быть сформирована по типу краевой части нотума или организована иначе, либо спикулы могут отсутствовать (Penney, 2008). Центральная часть *Ad. proxima* имеет вид сети, состоящей из хаотично расположенных двух- и четырехосных спикул. У *Ac. pilosa* спикулы в центральной части отсутствуют. Спикулы центральной части *O. muricata* ориентированы перпендикулярно передне-задней оси тела, расположены в несколько слоев. Эта часть тракта сформирована одноосными и четырехосными спикулами, плотно прилегающими друг к другу на протяжении всего тракта, в отличие от *O. bilamellata* (Linnaeus, 1767), для которого характерно понижение плотности спикул в центральной части нотума (Penney, 2018). Возможно, это связано с более крупными размерами *O. bilamellata* и, вероятно, большей толщиной покровов в данной части тела.

Спикулы вертикального тракта формируют розетку или расположены по кругу, либо вовсе отсутствуют (Penney, 2006, 2008; Kasamesiri, 2011). Вертикальный тракт *O. muricata* сложно организован. Спикулы выдаются за пределы папиллы, что было отмечено ранее методами сканирующей электронной микроскопии (Kress, 1981). Количество спикул в папилле не одинаково и зависит от ее размера (Millen, 1987). В папиллах диаметром 180 мкм на поверхность выступают 7–9 спикул, в папиллах диаметром 300 мкм — 19–21 спикула. Впервые показано, что в папилле находятся два слоя спикул, расположенных друг над другом в виде розетки. Главные оси спикул пересекаются, формируют плотное скопление. В отличие от *O. muricata* спикулы вертикального тракта *O. bilamellata* располагаются хаотично друг над другом (Penney, 2018).

У *Ad. proxima* спикулы на поверхности папилл формируют бугристость (рис. 4Б, В). Спикулы вертикального тракта у *Ac. pilosa*

отсутствуют, как и у *Ac. nanaimoensis* (O'Donoghue, 1921) (Penney, 2018). Однако для *Ac. pilosa* нами были отмечены сферические спикулы, расположенные вдоль стенки папилл. Сферические спикулы не выполняют опорную функцию, поскольку не формируют жесткий каркас. Вероятно, такой тип спикул необходим для уплотнения покровов. Ранее сферические спикулы были отмечены для одного вида семейства Discodorididae (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995; Sánchez-Tocino *et al.*, 2013).

Вертикальный тракт у основания папилл по Пенни (Penney, 2008) был определен нами в отдельный звездчатый тракт за характерную радиальную форму и иное строение по сравнению с вертикальным трактом в папиллах.

Спикулы звездчатого тракта располагаются радиально в основании папилл, выполняют важную поддерживающую функцию. Различие в строении звездчатых трактов исследуемых видов заключается в форме спикул, участвующих в образовании трактов, и в плотности их расположения друг относительно друга. У *Ac. pilosa* тракт представлен преимущественно одноосными спикулами, тогда как у *Ad. proxima* и *O. muricata* — преимущественно четырехосными, но встречаются двуосные и трехосные спикулы. Наиболее плотно звездчатые тракты расположены у *O. muricata* (рис. 3Д, Е) и *Ad. proxima* (рис. 4Г, Д), спикулы которых плотно стыкуются друг с другом (рис. 3З), в то время как у *Ac. pilosa* звездчатые тракты расположены достаточно далеко друг от друга и плотной спикульной сети не формируют (рис. 2Б, В). В отличие от *O. muricata*, спикулы ранее изученного *O. bilamellata* у основания папилл выглядят как неорганизованный бугорок, состоящий из скопления спикул, вдающийся в основание папиллы (Penney, 2018). Поскольку невозможно провести полноценного сравнения организации звездчатых трактов этих двух видов из-за разных методов изучения, то сложно объяснить данные отличия в строении.

Звездчатый тракт необходим для поддержания папилл с массивным вертикаль-

ным трактом, поэтому чем мощнее развит вертикальный тракт (*O. muricata* и *Ad. proxima*) и тяжелее папилла, тем лучше он развит. Звездчатый тракт *O. muricata* и *Ad. proxima* создает дополнительную жесткость тела, увеличивая как толщину спикульного слоя, так и толщину всех покровов.

Ранее для *O. muricata* методом сканирующей микроскопии была описана внешняя морфология одноосных спикул (Kress, 1981), в то время как полный спикульный состав *O. muricata* и других исследуемых видов оставался неизвестным до настоящей работы.

Биологическое значение спикульных трактов

Данные о строении спикульного комплекса в существующих работах сводятся к довольно разрозненным описаниям. В ряде работ (Sánchez-Tocino *et al.*, 2013; Alba-Tercedor, 2016; Penney, 2018) описаны тракты, а также типы спикул, входящие в их состав, без уточнения локализации. Другие работы (Kress, 1981; Cattaneo-Vietti *et al.*, 1993, 1995; Alvim *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013) содержат данные с описаниями типов спикул безотносительно локализации в тех или иных трактах или общей морфологии трактов без указания формирующих их типов спикул (Penney, 2006, 2008; Kasamesiri, 2011). Полученные нами данные о внешней и внутренней морфологии спикул, преобладающих типах спикул и их взаимном расположении значительно дополняют существующие работы. Анализируя полученные нами данные, можно сделать следующие обобщения: чем плотнее спикулы расположены друг относительно друга, тем более жесткий каркас формируется. Однако плотность покровов зависит не от количества спикул, а от характера их взаимного расположения и толщины слоя, в котором они находятся.

Для изученных видов характерен тот же набор спикул, что для других дорид (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1995). Для каждого изученного вида описан преобладающий тип спикул (рис. 5): для *Ac. pilosa* — это одноосный, сами спикулы расположены рыхло, зачастую хао-

тично. Особи этого вида достигают наибольшего размера, а относительная толщина стенки тела максимальная среди трех изучаемых видов, таким образом, толщина покровов компенсирует отсутствие плотного слоя спикул. У *O. muricata* преобладающий тип спикул — четырехосный, он обеспечивает характерный способ упаковки спикул по принципу «ключ–замок», что делает спикульный слой прочнее. При этом *O. muricata* достигает наименьших размеров среди изучаемых нами видов, а плотность стенки тела обеспечивается толщиной спикульного слоя, а не толщиной покровов, как у *Ac. pilosa*. Преобладающий тип спикул для *Ad. proxima* выделить сложно, поскольку все виды спикул встречаются примерно в равном соотношении. Плотность расположения спикул одинакова во всем слое, толщина спикульного слоя превышает толщину стенки тела. Таким образом, жесткость покровов *Ad. proxima* обеспечивается спикульным слоем, как у *O. muricata*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ББС МГУ им. Н.А. Перцова и кафедры зоологии беспозвоночных МГУ им. М.В. Ломоносова А.А. Семенову, А.Э. Жадан, А.Л. Михлиной, И.А. Екимовой, А.А. Прудковскому за помощь в сборе материала; И.А. Косевичу, Б.В. Осадченко, Г.Д. Колбасовой за ценные советы по методологии подготовки образцов к микроскопии; Ф.В. Большакову, А.И. Лаврову, а также сотрудникам межкафедральной лаборатории электронной микроскопии, Г.Н. Давидовичу, А.Г. Богданову, за помощь в проведении исследований методом сканирующей электронной микроскопии. Профессору кафедры зоологии беспозвоночных А.Б. Цетлину авторы выражают благодарность за плодотворное обсуждение работы и помощь в подготовке публикации, а рецензентам — за ценные советы и замечания при работе с текстом.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 18-34-00251 (проведение микроскопических исследований), 18-05-

60158 (сбор материала), 19-04-00501 (подготовка материала к исследованиям). Работа была поддержана грантом МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ «Депозитарий живых систем Московского университета» в рамках Программы развития МГУ.

Список литературы

- Alba-Tercedor J., Sanchez-Tocino L. 2011. The use of the SkyScan 1172 high-resolution microCT to elucidate if the spicules of the “sea slugs” (Mollusca: Nudibranchia, Opisthobranchia) have a structural or a defensive function // MicroCT User Meeting Abstract Book. No.1981. P.113–121.
- Alvim J., Padula V., Pimenta A.D. 2011. First record of the genus *Onchidoris* (Gastropoda: Nudibranchia: Onchidorididae) from the South Atlantic Ocean, with the description of a new species from Brazil // J. Mar. Biol. Assoc. UK. Vol.91. No.2. P.505–511.
- Cattaneo-Vietti R., Angelini S., Bavestrello G. 1993. Skin and gut spicules in *Discodoris atromaculata* (Bergh, 1880) (Mollusca: Nudibranchia) // Bollettino Malacologico, Vol.28 P.173–180.
- Cattaneo-Vietti R., Angelini S., Gaggero L., Lucchetti G. 1995. Mineral composition of nudibranch spicules // J. Molluscan Stud. Vol.61. No.3. P.331–337.
- Chang W., Willian R.C., Mok, H.K. 2013. Can the morphology of the integumentary spicules be used to distinguish genera and species of phyllidiid nudibranchs (Porostomata: Phyllidiidae)? // Molluscan Res. Vol.33. No.1. P.14–23.
- Dean L.J., Prinsep M.R. 2017. The chemistry and chemical ecology of nudibranchs // Nat. Prod. Rep. Vol.34. No.12. P.1359–1390.
- Ehrlich H. 2010. Invertebrates // Biological Materials of Marine Origin. Springer. P.212–218.
- Foale S.J., Willan R.C. 1987. Scanning and transmission electron microscope study of specialized mantle structures in dorid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia: Anthobranchia) // Mar. Biol. Vol.95. P.547–557.
- Goodheart J.A., Bely A.E. 2017. Sequestration of nematocysts by divergent cnidarian predators: mechanism, function, and evolution // Invert. Biol. Vol.136. No.1. P.75–91.
- Hallas J.M., Chichvarkhin A., Gosliner T.M. 2017. Aligning evidence: concerns regarding multiple sequence alignments in estimating the phylogeny of the Nudibranchia suborder Doridina // R. Soc. open sci. Vol.4. No.10. P.171095.
- Kasamesiri P., Meksumpun S., Meksumpun C. 2011. Spicule network patterns of *Phyllidia varicosa* // ScienceAsia. Vol.37. No.2. P.160.
- Kress A.A. 1981. Scanning electron microscope study of notum structures in some dorid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia) // J. Mar. Biol. Ass. UK. Vol.61. No.1. P.177–191.
- Lankester E.R. 1883. Mollusca // Encyclopedia Britannica. Vol.9.
- Millen S.V. 1987. The nudibranch genus *Adalaria*, with a description of a new species from the northeastern Pacific // Can.J. Zool. Vol.65. P.2696–2702.
- Millonig G. 1964. Study on the factors which influence preservation of fine structure // Symposium on electron microscopy. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche. P.347.
- Odum H.T. 1951. Nudibranch spicules made of amorphous calcium carbonate // Science. Vol.114. No.2963. P.395.
- Penney B.K. 2006. Morphology and biological roles of spicule networks in *Cadlina luteomarginata* (Nudibranchia, Doridina) // Inver. Biol. Vol.125. No.3. P.222–232.
- Penney B.K. 2008. Phylogenetic comparison of spicule networks in cryptobranchiate dorid nudibranchs (Gastropoda, Euthyneura, Nudibranchia, Doridina) // Acta Zool. Vol.89. No.4. P.311–329.
- Penney B.K., Ehresmann K.R., Jordan K.J., Rufo G. 2018. Micro-computed tomography of spicule networks in three genera of dorid sea-slugs (Gastropoda: Nudipleura: Doridina) shows patterns of phylogenetic significance // Acta Zool. P.1–19.
- Pola M., Gosliner T.M. 2010. The first molecular phylogeny of cladobranchian opisthobranchs (Mollusca, Gastropoda, Nudibranchia) // Mol. Phylogenet. Evol. Vol.56. No.3. P.931–941.
- Potts G.W. 1981. The anatomy of respiratory structures in the dorid nudibranchs, *Onchidoris bilamellata* and *Archidoris pseudoargus*, with details of the epidermal glands // J. Mar. Biol. Assoc. UK. Vol.61. No.4. P.959–982.
- Rose R.A. 1986. Direct Development in *Rostanga arbutus* (Angas) (Mollusca: Nudibranchia) and the effects of temperature and salinity on embryos reared in the laboratory // J. Malacol. Soc. of Australia. Vol.7. No.3–4. P.141–154.
- Sánchez-Tocino L., Tierno de Figueroa J.M., Cervera J.L. 2014. Ontogenetic changes in the spicule formation and their possible role in chromodorid opisthobranchs (Mollusca, Chromodorididae) // Mar. Biol. Res. Vol.10. No.4. P.357–373.
- Thompson T.E., Bebbington A. 1969. Structure and function of the reproductive organs of three species of *Aplysia* (Gastropoda: Opisthobranchia) // Malacologia Vol.7. No.2–3. P.347–380.
- Wägele H., Klussmann-Kolb A., Verbeek E. 2014. Flashback and foreshadowing — a review of the taxon Opisthobranchia // Org. Divers. Evol. Vol.14. No.1. P.133–149.

Ответственный редактор Е.Н. Темерева