

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
Научный совет по проблеме
КОНОМЕРНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ
И УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССАМИ ОНТОГЕНЕЗА»

ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

ОБЪЕКТЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

МОСКВА

1975

Объекты биологии развития. М., «Наука», 1975.

Монография представляет собой вторую книгу из серии «Проблемы биологии развития». Это справочно-методическое пособие по биологии размножения, искусственному разведению и содержанию, а также по нормальному развитию более 20 видов животных, являющихся основным объектом биологии развития. В ней впервые в нашей литературе публикуются таблицы их нормального развития, в том числе таблицы, разработанные специально для этого издания. Книга рассчитана на биологов широкого профиля, биохимиков, медиков, специалистов сельского хозяйства, аспирантов и студентов.

Редакционная коллегия серии «Проблемы биологии развития»:

Б. Л. Астауров (главный редактор),

Т. А. Детлаф (зам. главного редактора),

А. Е. Гайсинович (ответственный секретарь),

В. Я. Бродский, А. П. Дыбан, Г. В. Лопашов,

Б. П. Токин

Ответственный редактор

Т. А. Детлаф

X

МОРСКИЕ ЕЖИ STRONGYLOCENTROTUS DRÖBACHIENSIS, S. NUDUS, S. INTERMEDIUS

Еще в прошлом веке были обнаружены важные и непреходящие достоинства морских ежей как объекта биологических исследований — возможность получения больших партий гамет и синхронно развивающихся зародышей, простота инкубации зародышей в контролируемых условиях, легкость многих прижизненных наблюдений и обработки фиксированного материала. В ходе последующих многолетних работ были установлены также хорошая проницаемость яйцеклеток и зародышей для многих веществ, в том числе для аминокислот и нуклеозидов, относительная простота выделения субклеточных фракций, возможность получения больших количеств партеногенетических зародышей, безъядерных зародышей, межвидовых гибридов и т. д. (Harvey, 1956; Tyler, Tyler, 1966; Berg, 1967; Hinegardner, 1967; Reverberi, 1971; Czihak, 1973; Giudice, 1973; Hörstadius, 1973). Все это привело к широкому использованию гамет и зародышей морских ежей для работ по разнообразным проблемам биологии развития и по проблемам молекулярной биологии и цитологии (Tyler, Tyler, 1966; Berg, 1967; Czihak, 1973; Hörstadius, 1973). Кроме того, зародыши морских ежей все шире применяются для массового токсикологического и фармакологического тестирования различных препаратов, в том числе потенциальных канцеролитиков и тератогенов (Mateyko, 1967; Бузников, 1967; Gustafson, Toneby, 1970, 1971; Бузников и др., 1972; Hagström, Lönning, 1973).

Использование рассматриваемого объекта имеет и определенные ограничения. Во многих случаях они носят технический характер (трудности доставки морских ежей в удаленные от моря научные центры, отсутствие необходимой современной аппаратуры на многих морских биостанциях и т. д.). Более принципиальными являются ограничения, обусловленные трудностями инкубации морских ежей на поздних стадиях развития (начиная с момента перехода к активному питанию) (Hinegardner, 1967, 1969). Поэтому морские ежи редко используются в работах, связанных с анализом процессов позднего морфогенеза, и практически не применяются для исследований, требующих доведения развития подопытных животных до imago.

При работе на морских ежах советские авторы чаще всего используют следующие виды *Strongylocentrotus*: *S. dröbachiensis*, *S. nudus* и *S. intermedius*. Материалы по этим видам будут приведены ниже. Сведения о многих других видах морских ежей, наиболее часто используемых в работах западных авторов, можно найти в литературе (см., например, Harvey, 1956; Costello et al., 1957; Tyler, Tyler, 1966; Hinegardner, 1967; Reverberi, 1971; Hörstadius, 1973).

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ
И УСЛОВИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ

Тип Echinodermata, класс Echinoidea, отряд Centechinoidea, подотряд Camarodonta, семейство Strongylocentrotidae, виды Strongylocentrotus dröbachiensis (O. F. Müller), *S. nudus* (A. Agassiz), *S. intermedius* (A. Agassiz), (Harvey, 1956) по Кларку (H. L. Clark) и Мортенсену (T. Mortensen).

S. dröbachiensis. Широко распространенный вид, встречающийся у нас в морях Северного Ледовитого океана, а также в Беринговом море (Гаевская, 1948). В Белом море относительно редок, а в Баренцевом является массовым видом. Самки со зрелыми гонадами могут быть добыты на сублиторали с конца мая по первые числа июля (Дальне-Зеленцовская губа), температура воды 4—8°; на больших глубинах созревание и выметывание яйцеклеток происходит на 1—2 недели позже. Эти сроки могут очень изменяться в связи с метеорологическими условиями. Самки со зрелыми гонадами повторно обнаруживаются на сублиторали в сентябре — октябре; качество икры, полученной в этот период, обычно хуже, чем в основной сезон размножения. Самцы со зрелыми гонадами имеются на сублиторали в течение гораздо более длительного времени (по крайней мере от февраля — марта до октября).

S. nudus. В заливе Петра Великого (Японское море) обычен, в Охотском море отсутствует (Павловский, 1955). Самки со зрелыми гонадами встречаются на сублиторали обычно с начала июля до 2—3-й декады августа (температура воды 16—24°); самцы со зрелыми гонадами появляются раньше и исчезают позже.

S. intermedius. Массовый вид, часто встречающийся вместе с предыдущим, но заходящий дальше на север, в Татарский пролив и Охотское море (Павловский, 1955). Сезон размножения в заливе Петра Великого начинается несколько позже, чем у *S. nudus*, — с конца июля или первых чисел августа и продолжается дольше, по крайней мере до первой половины октября, температура воды 18—24°; осенью зрелых ежей можно встретить и при более низких температурах (Гнездилова, 1971).

Рассматриваемые виды не имеют полового диморфизма, и их пол может быть определен либо путем вскрытия (см. ниже), либо путем некоторых специальных процедур (Harvey, 1956; Hinegardner, 1967; Stephens, 1972). Для определения пола незрелого животного используют биопсию; кусочек гонады берут с помощью шприца сквозь стенку перистома и исследуют под микроскопом. Для определения пола у зрелых особей применимо резкое встряхивание животного, приводящее к вытеканию некоторого количества яйцеклеток или спермы из гонопоров. Те же результаты дает инъекция 0,5 М КСl в перивисцеральную полость (0,5—1 мл при инъекции сквозь стенку перистома и 0,2—0,5 мл при инъекции в один из гонопоров). Ежа после встряхивания или инъекции помещают аборальной стороной вниз на чашку Петри или стаканчик, заполненный морской водой, чтобы собрать вытекающие половые продукты. К вытеканию половых продуктов из гонопоров приводит и электрическое раздражение животного (переменный ток 10в, электроды свинцовые).

ТРАНСПОРТИРОВКА И СОДЕРЖАНИЕ
ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Морские ежи сохраняются на холоду (0—5°) без воды в течение 1—2 суток после отлова; при больших сроках хранения происходит выметывание или повреждение половых продуктов и гибель животных. В аквариумах с проточной морской водой морские ежи могут жить без повреждения гонад от нескольких дней до 2—5 недель при температуре не выше 6—8° (*S. dröbachiensis*) или 20—22° (*S. nudus*, *S. intermedius*). Эти сроки при более низких температурах воды и при кормлении животных увеличиваются; в качестве корма пригодны водоросли, особенно ламинария.

Для транспортировки морских ежей на большие расстояния удобны обычные сумки-холодильники. На дно сумки кладут слой льда, приготовленного из морской воды, затем помещают морских ежей (в количестве, занимающем не более $\frac{2}{3}$ объема сумки при неплотной упаковке), заливают ежей холодной морской водой, сверху кладут еще один слой морского льда и закрывают сумку. Небольшие количества *S. nudus* или *S. intermedius* можно перевозить и без охлаждения, в аэрируемой морской воде или без воды. Транспортировка должна занимать не более двух суток.

Способы прижизненной оценки пола и степени зрелости половых продуктов (см. выше) у ежей, предназначенных для перевозки, не применимы, так как могут провоцировать выметывание половых продуктов. Поэтому о состоянии партии морских ежей, отобранных для перевозки (распределение по полу, процент особей со зрелыми гонадами), приходится судить по результатам избирательной проверки некоторого количества животных из этой партии.

Для выдерживания морских ежей после транспортировки удобны аквариумы с круговой циркуляцией воды и ее непрерывной аэрацией: в аквариум емкостью 150 л можно поместить 50—75 животных среднего размера. В этих условиях при температуре воды 2—6° нам удавалось сохранять половозрелых *S. dröbachiensis* в пригодном для работы состоянии до 4 недель; кормление животных позволяет увеличить этот срок до 2 месяцев (Stephens, 1972), но требует применения специальных систем для очистки воды.

Для заполнения аквариумов пригодна искусственная морская вода. Существует много рецептов этой воды (Harvey, 1956; Tyler, Tyler, 1966; Hinegardner, 1967). Ограничимся одним из них (табл. 13), успешно используемым многими американскими авторами, а также в Лаборатории физиологии им. X. С. Коштыянца Института биологии развития АН СССР. Соли («хч» или «чда») растворяют в дистиллированной воде. Можно заранее приготовить концентрированные (маточные) растворы всех солей, за исключением NaCl; концентрации этих растворов даны в табл. 13.

pH готовой воды должен лежать в пределах 7,4—8,0; иные значения pH обычно свидетельствуют о недоброкачественности какого-либо из компонентов (чаще всего NaHCO_3). Помимо проверки pH желательно проверить и действие свежеприготовленной морской воды на взрослых морских ежах, гаметах и зародышах. Неспособность взрослых животных прикрепляться к субстрату, неподвижность сперматозоидов, низкий процент оплодотворения, аномальные деления дробления — все это может быть след-

ствием непригодности какого-либо из компонентов морской воды (чаще всего NaHCO_3 , MgCl_2 или CaCl_2).

Контролируя температурные условия инкубации взрослых ежей, можно существенно удлинить экспериментальный сезон. Так, можно ускорить появление особей *S. dröbachiensis* со зрелыми половыми продуктами на несколько недель, если собирать ежей в начале апреля (Дальне-Зелепецкая губа), т. е. за 1,5—2 месяца до начала сезона массового размножения, и инкубировать их при 7—8°, что на несколько градусов выше

Таблица 13

Состав искусственной морской воды

Соли	В г на 1 л		Маточный раствор (в мл на 50 л морской воды)
	готовая морская вода	маточный раствор	
NaCl	26,05	—	1302,52
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,20	776	на 50 л готовой воды 335
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,48	448	500
KCl	0,69	276	125
NaHCO_3	0,198	39,7	250
CaCl_2 *	1,43	285,2 **	250

* Добавляется в последнюю очередь.

** 562,7 г/мл, если взят $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

температуры воды в естественных условиях. Наоборот, понижая температуру инкубации для особей, собранных во время сезона размножения, можно задержать выметывание половых продуктов. Так, Стивенс (1972), инкубируя взрослых *S. dröbachiensis* при 4° (что на 2—5° ниже температуры воды во время сезона размножения), получал от них зрелые половые продукты в течение 2 месяцев после завершения сезона размножения на сублиторали. В. В. Евдокимов (1973) описал технику получения зрелых половых продуктов от *S. nudus* и *S. intermedius* вне сезона размножения этих видов. Взрослые животные, собранные поздней осенью, зимой или весной, инкубируются в аквариумах с проточной морской водой, температура которой регулируется автоматически. Исходная температура совпадает с таковой в естественных условиях, а затем медленно (на 1° в день) повышается до уровня, характерного для сезона размножения; кормление животных при этом обязательно.

ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И НЕЗРЕЛЫХ ООЦИТОВ

Ежей вскрывают, делая ножницами круговой разрез несколько выше «экватора», удаляют оральную стенку тела и кишечник с содержимым. Пол вскрытых животных определяют по цвету половых продуктов, выступающих на поверхности гонад в поврежденных при вскрытии участках (сперма — белая, икра — желтоватая у *S. dröbachiensis* и *S. nudus*).

и оранжевая у *S. intermedius*). При некотором опыте работы на данном виде пол животных можно определить и по внешнему виду неповрежденных гонад.

Пинцетом берут кусочек гонады и осторожно прикасаются им к поверхности сухого предметного стекла. Полученный таким способом мазок рассматривают под микроскопом; к мазку спермы перед просмотром прибавляют каплю морской воды; для взятия семенников и яичников используют разные пинцеты. Внешний вид нормальных яйцеклеток показан на табл. XVII 1; самок с поврежденными яйцеклетками (резкая деформация, признаки лизиса) и самцов с неподвижными сперматозоидами отбраковывают. В тех случаях, когда примесь ооцитов нежелательна, отбраковывают также и самок с большим процентом ооцитов, опознаваемых по крупному пузыревидному ядру с ядрышком. Во многих случаях вся описанная процедура является излишней, и для отбора доброкачественных половых продуктов достаточно провести пробное осеменение (см. ниже).

У отобранного самца берут семенники и разрезают их пополам; вытекающие из разрезов капли спермы разводят морской водой (для использования — см. ниже) или собирают в сухой стеклянный стаканчик (для хранения). «Сухая» сперма хранится в холодильнике без повреждений не менее 24—48 час., а сперма, разбавленная морской водой, — до 12—24 час.

Отобранных самок помещают на стаканчики, заполненные морской водой (абортальный полюс животного должен быть погружен в воду), и заливают вскрытую полость тела 0,5 М KCl. Почти сразу после этого из гонопоров начинают вытекать струйками зрелые яйца, довольно быстро оседающие на дно стаканчика. Основная масса яиц, до нескольких миллионов от каждой самки, вытекает в воду за 15—30 мин. Затем воду из стаканчика сливают, заменяют свежей и дают яйцам снова осесть; эту процедуру повторяют 2—3 раза. Полученные отмыее яйца желательно сразу же использовать для опыта. В случае необходимости их можно хранить в холодильнике без перемешивания до 24 час. Добавление в воду сульфаниламидных препаратов или антибиотиков позволяет несколько удлинить этот срок (Mertes, Berg, 1962; Stephens, 1972). Хорошие результаты дает смесь стрептомицина и окситетрациклина, по 50—100 мкг/мл воды.

При действии KCl из гонопоров вытекают, как правило, только зрелые яйца, а ооциты остаются в яичниках. Поэтому описанная процедура позволяет получить чистую суспензию яиц даже от таких самок, в гонадах которых, наряду со зрелыми яйцами, содержится некоторое (не свыше 5—10%) количество ооцитов. В разгар сезона размножения у большинства самок в гонадах уже нет ооцитов. При работе на таких животных можно, как это часто делают, не использовать раствор KCl, а просто извлекать пинцетом гонады и вытряхивать яйца сквозь мельничный газ в воду.

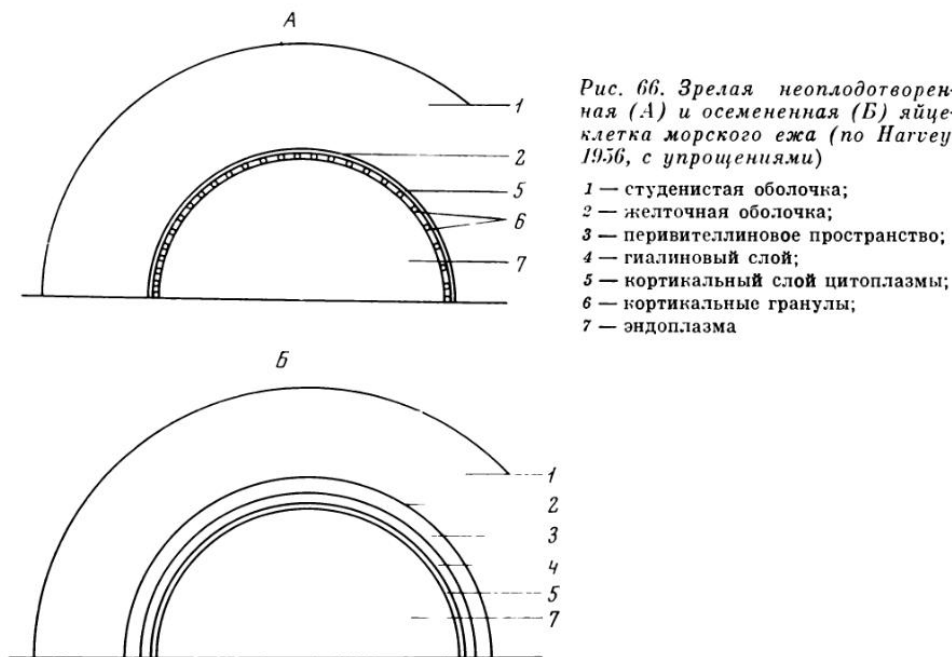
При необходимости одномоментного получения половых продуктов от большого числа животных работу удобно проводить следующим образом. Один из работающих вводит животным в перивисцеральную полость по 0,5—2,0 мл 0,5 М KCl с помощью большого шприца и помещает инъекцированных ежей абортальной стороной вниз на стол, покрытый темным пластиком. На темном фоне хорошо виден цвет вытекающих половых продуктов, что позволяет остальным работающим быстро отбирать зре-

лых животных пужного пола для последующего вскрытия и получения материала.

В ряде случаев представляется удобным получать половые продукты, не прибегая к вскрытию животного и сохраняя его неповрежденным. Для этого применяются те же способы, что и для определения пола и степени зрелости половых продуктов (см. выше). Для полного одномоментного освобождения животного от зрелых половых продуктов может быть рекомендована инъекция больших (2—15 мл, в зависимости от размеров животного) объемов 0,5 М КСl в перивисцеральную полость (Stephens, 1972). Для многократного получения половых продуктов от одной и той же особи удобно электрическое раздражение; икра или сперма перестают вытекать из гонопоров сразу по прекращении раздражения и начинают течь снова, когда раздражение возобновляется.

При получении половых продуктов от плоских ежей, несколько видов которых (*Echinarachnius parma*, *Scaphechinus mirabilis*, *S. griseus*) доступны для работы на морских станциях Дальнего Востока, вообще не рекомендуется прибегать к вскрытию животных. Здесь очень удобной является инъекция небольших количеств (для *S. mirabilis* — 0,1—0,2 мл) 0,5 М КСl сквозь стенку перистомы с последующим помещением инъекцированных животных аборальной стороной вниз на заполненные морской водой пенициллиновые флаконы. После оседания половых продуктов (яйцеклеток или сгустков спермы) на дно флакона морскую воду заменяют свежей; такой однократно промытый материал пригоден для работы. Отметим, кстати, что, по нашим наблюдениям 1973 г., зрелые особи *S. mirabilis* появились в заливе Посыета (бухта Песчаная) с 20 сентября и присутствовали, по крайней мере, до первых чисел октября (более поздние наблюдения не проводились).

Сказанное можно дополнить следующими практическими замечаниями: а) получение половых продуктов от морских ежей должно проводиться при оптимальных температурах — в случае *S. dröbachiensis* при 2—8° и никоим образом не выше 10°, в случае *S. nudus* и *S. intermedius* при 15—22° и никоим образом не выше 25°; б) используемая для работы морская вода должна быть в зависимости от требований работы профильтрована через ватные, бумажные или миллипоровые фильтры. Во многих случаях (даже при работе на морских станциях) рекомендуется применять искусственную морскую воду; в) для очистки суспензии яиц от посторонних частиц ее следует фильтровать сквозь мельничный газ. В ходе фильтрации яйцеклетки обычно освобождаются от студенистых оболочек. Имеются и специальные методы разрушения студенистых оболочек, основанные на различных химических и физико-химических воздействиях (Harvey, 1956; Berg, 1967). Чаще всего для этой цели используется подкисление морской воды. Так, Стивенс (1972) рекомендует для *S. dröbachiensis* следующую процедуру: рН морской воды, в которой суспендированы яйцеклетки, быстро доводят до 5 (не ниже), добавляя по каплям 0,1 н. НСl, после чего сразу же осаждают яйцеклетки с помощью ручной центрифуги и трижды промывают их нормальной морской водой. Вообще удаление студенистых оболочек признается желательным, поскольку в их присутствии повышается вероятность инфицирования зародышей (Tyler, Tyler, 1966); г) для того чтобы предотвратить возможное загрязнение инструментария, посуды, мельничного газа и т. д. спермой, необходимо время от времени ополаскивать их пресной водой. В противном случае среди подготовленных для работы



неоплодотворенных яйцеклеток может неожиданно обнаружиться значительное количество зародышей на различных стадиях развития.

Получение ооцитов. Среди иглокожих наиболее удобными объектами при работе на ооцитах являются морские звезды (Hinegardner, 1967); однако в ряде случаев для этой цели используются и морские ежи. У *S. dröbachiensis* в начале сезона размножения довольно часто встречаются самки, в гонадах которых еще нет зрелых яйцеклеток, но содержится большое количество ооцитов, завершивших большой рост. Эти ооциты легко вытряхиваются из яичников в воду. Если в яичниках имеется смесь зрелых яиц и ооцитов, то можно разделить ее с помощью 0,5 М KCl; после инъекции раствора KCl яйца вытекут, а ооциты останутся в гонадах, откуда их можно будет извлечь (Giudice et. al., 1972; см. также Озернюк, 1974).

СТРОЕНИЕ ЯЙЦА

Как при естественном выметывании половых продуктов, так и при стимуляции выметывания какими-либо специальными воздействиями (электрическое раздражение, введение 0,5 М KCl), самки морских ежей выделяют в воду зрелые яйца. Деления созревания и формирование обоих направительных телец осуществляются, таким образом, еще до выметывания яиц или до их получения с помощью описанной выше стандартной процедуры. Такие яйца готовы к оплодотворению и сохраняют эту способность довольно долго (сроки хранения указаны выше). Форма яйцеклеток может довольно сильно отклоняться от шарообразной (см. табл. XVII). Их средний диаметр составляет у *S. dröbachiensis* и *S. nudus* около 160 и у *S. intermedius* около 140 мкм (без студенистой оболочки).

На рис. 66 дана упрощенная схема соотношения некоторых поверхностных структур яйца до и после осеменения. Внешней оболочкой яйца является студенистая оболочка, легко разрушающаяся как при выделении яйцеклеток (см. выше), так и при их длительном хранении (Harvey, 1956). Далее следует тонкая желточная оболочка, которая плотно прилегает к плазматической мембране яйца. Под плазматической мембраной располагается слой цитоплазмы, содержащий многочисленные кортикальные гранулы. Для яиц рассматриваемых видов морских ежей, как и вообще иглокожих, характерно низкое содержание желтка (олиголецитальные яйца). Отметим также, что у видов рода *Strongylocentrotus*, как и большинства других видов морских ежей (Harvey, 1956; Hörstadius, 1973), неоплодотворенные яйца не имеют морфологически выраженной полярности.

ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

У морских ежей осеменение внешнее и оплодотворение моноспермное; все случаи полиспермии могут рассматриваться как патологические. При хорошем исходном качестве половых продуктов и оптимальных внешних условиях относительное количество полиспермно осемененных яиц не превышает десятых долей процента (Harvey, 1956; Гипзбург, 1968).

Искусственное осеменение следует проводить при оптимальных температурных условиях, совпадающих с таковыми при последующей инкубации зародышей (см. ниже.) Яйцам, суспендированным в морской воде, дают осесть и сливают большую часть воды. Каплю «сухой» спермы разводят 5 мл морской воды. Разбавленную сперму смешивают с яйцами (по 0,1—0,5 мл спермы на 100 мл густой суспензии яйцеклеток). Через 1—2 мин. суспензию разбавляют в 10—15 раз морской водой и после оседания яйцеклеток заменяют воду свежей. В случае необходимости применяют 2—3-кратную промывку яиц морской водой с помощью ручной центрифуги. Центрифугирование следует проводить осторожно, так как оно может вызвать слипание яиц; хорошим средством против слипания является промывка яиц морской водой, охлажденной до 0°, или искусственной морской водой без ионов кальция. Последнюю процедуру можно начинать не раньше чем через 30—60 сек. после внесения спермы, поскольку в бескальциевой морской воде оплодотворения не происходит. Описанная техника искусственного осеменения является общепринятой, ее употребляют с теми или иными несущественными модификациями все исследователи (см., например, Harvey, 1956; Hinegardner, 1967; Stephens, 1972).

Первым внешним признаком успешного оплодотворения является отхождение желточной оболочки от поверхности плазматической мембраны и образование между ними перивителлинового пространства. (Отходящую желточную оболочку принято называть «оболочкой оплодотворения».) В основе этих явлений лежит выделение кортикальных гранул, приводящее к насыщению воды ионе в пространство между желточной оболочкой и клеточной мембраной. Кортикальная реакция начинается по завершении определенного латентного периода в точке проникновения сперматозоида в яйцеклетку и постепенно охватывает всю поверхность яйцеклетки. Характер начальных изменений осемененных

яйцеклеток изучен у морских ежей очень хорошо; обзор соответствующих материалов дан в монографии А. С. Гинзбург (1968). У *S. dröbachiensis* при 8° длительность латентного периода обычно составляет 60—70 сек., выделение содержимого кортикальных гранул, пачавшись, охватывает всю поверхность яйцеклетки за 90 сек., причем заметное отхождение оболочки оплодотворения отстает от выделения кортикальных гранул на 30—40 сек. Таким образом, с момента осеменения до отхождения всей оболочки оплодотворения проходит в общей сложности около 3 мин. (Гинзбург, 1968). У *S. nudus* и *S. intermedius* весь этот процесс занимает при 20° около 30 сек.

При нормальном отхождении оболочки оплодотворения яйцеклетка сохраняет сферическую форму и практически не изменяется в объеме (Harvey, 1956). Образующееся перивителлиновое пространство выглядит в оптическом разрезе как полумесяц, концы которого все больше охватывают яйцеклетку и затем смыкаются на противоположном полюсе. Вначале перивителлиновое пространство имеет наибольшую ширину в месте, где началось его образование, и наименьшую ширину — на противоположном полюсе яйцеклетки. Спустя некоторое время (у *S. dröbachiensis* при 8° через 5 мин. после осеменения — Stephens, 1972) эти различия исчезают.

Непосредственно после отхождения оболочки оплодотворения начинается образование гиалинового слоя, плотно прилегающего к плазматической мембране. Этот слой возникает за счет содержимого кортикальных гранул, а может быть и других веществ цитоплазматического происхождения (Harvey, 1956; Runnström, 1966; Гинзбург, 1968). Гиалиновый слой постепенно утолщается; он достигает своих окончательных размеров у *S. dröbachiensis* при 8° через 75 мин. после осеменения (Stephens, 1972), но становится заметным уже на 15—18-й минуте. Именно этот слой соединяет между собой бластомеры, образующиеся в ходе делений дробления; разрушение гиалинового слоя приводит к дезагрегации клеток зародыша (Harvey, 1956; Giudice, Mutolo, 1970). Соотношение оболочки и поверхностных слоев яйцеклетки после осеменения представлено схематически на рис. 66 (см. также рис. 67).

Некоторые практические указания.

а. Партии яйцеклеток с процентом оплодотворения ниже 95 (в особо ответственных случаях — ниже 99) и с аномалиями отхождения оболочки оплодотворения (несколько полюсов отхождения, деформация перивителлинового пространства и т. д.) следует браковать. Разумеется, перед этим надо убедиться, что наблюдаемые аномалии не вызваны отклонением от оптимальных внешних условий. На практике, прежде чем переходить к работе на данной партии, удобно провести пробное осеменение небольшого количества яйцеклеток. О результатах пробного осеменения судят по отхождению оболочки оплодотворения, а в случае надобности — и по прохождению первых стадий развития. Пробное осеменение позволяет быстро и надежно оценить как качество половых продуктов, так и условия инкубации.

б. Для осеменения можно использовать смесь спермы от нескольких самцов (за исключением случаев, когда требования к однородности материала особенно высоки). В то же время желательного обходиться без смешивания яйцеклеток от нескольких самок, хотя часто (например, при проведении многих биохимических опытов) оно оказывается неизбежным.

в. Удаление оболочки оплодотворения (если оно необходимо для по-

следующей работы) лучше делать в первые минуты после осеменения. Можно также разрушать желточную оболочку до осеменения. Из многочисленных способов удаления оболочки оплодотворения (Harvey, 1956; Burchill, Blomquist, 1969; Epel, 1970; Epel et al., 1970) вкратце опишем один (Hynes, Gross, 1970), апробированный нами на всех трех рассматриваемых видах. Яйцеклетки помещают в смесь, содержащую 0,04% панаина и 0,2% цистенна, приготовленную на морской воде. Сперму суспендируют в такой же смеси и проводят искусственное осеменение, через 5—10 мин. после которого отмывают яйцеклетки морской водой. Если яйцеклетки после удаления оболочек оплодотворения обнаруживают тенденцию к слипанию, желательно использовать для первой отмывки искусственную морскую воду, не содержащую ионов кальция.

ИНКУБАЦИЯ ЗАРОДЫШЕЙ

Зародыши морских ежей, инкубируемые в открытых сосудах при оптимальных температурных условиях и без перемешивания или аэрирования воды, развиваются нормально, если лежат на дне сосуда не более чем одним слоем. Толщина слоя воды не должна превышать при этом нескольких сантиметров. Малые (не свыше 1000) количества зародышей рассматриваемых видов можно инкубировать в стаканчиках емкостью 1—2 мл (фармакологические стаканчики), пенициллиновых флаконах и т. п. Большие количества зародышей можно инкубировать в кристаллизаторах, чашках Петри и т. п. при соблюдении «правила монослоя» (что соответствует концентрации зародышей 5000/мл). Если же концентрация зародышей выше, то становится необходимым перемешивание или аэрирование воды.

Для перемешивания удобны мешалки различной формы, сделанные из органического стекла (толщина 1—3 мм) и соединенные с электромоторами типа ДСД-60 при помощи резиновой трубки. Эти моторы имеют постоянную скорость вращения 60 об/мин., оптимальную для данной цели (при меньшей скорости икра оседает на дно, а при большей повреждается); гибкое соединение мешалки с ротором позволяет избежать возникновения застойных зон в инкубационном сосуде. Емкость последнего может достигать 5—10 л в зависимости от его формы, а также формы и веса мешалки. Для перемешивания больших объемов жидкости используют несколько моторов одновременно. Развитие зародышей в перемешиваемой суспензии идет вполне нормально при густоте суспензии до 100 000 зародышей в 1 мл (Hinegardner, 1967). Описываемый способ не только позволяет инкубировать большие количества материала, но и облегчает многократное взятие нужного числа зародышей из инкубационного сосуда.

Описанный способ инкубации применим как для зародышей, так и для личинок, вплоть до перехода последних к активному питанию. Техника инкубации активно питающихся личинок морских ежей, как уже упоминалось, сложна (ее описание см. Hinegardner, 1969).

Применяются и другие способы перемешивания густых суспензий зародышей, основанные на использовании магнитных мешалок, шюттель-аппаратов, вибраторов, микрокомпрессоров и т. д. (Costello et al., 1957; Tyler, Tyler, 1966; Hinegardner, 1967, 1969). Все эти способы, как прави-

ло, дают хорошие результаты. Лишь перемешивание суспензии пузырьками воздуха, по нашим наблюдениям, часто приводит к повреждению зародышей и поэтому не может быть рекомендовано.

Дополнительные практические указания.

а. При инкубации зародышей, как и при искусственном осеменении, необходимо соблюдать оптимальные температурные условия: для *S. dröbachiensis* это 4—8° (впрочем, развитие идет нормально, хотя и очень медленно, и при 0°) (Stephens, 1972), для *S. nudus* и *S. intermedius* — 15—22° (собственные наблюдения). Развитие зародышей резко нарушается при температуре >10° (*S. dröbachiensis* — Stephens, 1972) или >25° (*S. nudus* и *S. intermedius* — собственные наблюдения). Развитие последних двух видов нарушается, хотя и не столь резко, при 10—14°; влияние более низких температур нами не проверялось.

б. При инкубации густой суспензии зародышей необходимо хотя бы один раз сменить воду, причем делать это лучше сразу после вылушления, во время которого в воду поступает большое количество органического материала.

в. При работе на густых суспензиях зародышей следует иметь в виду, что развивающиеся зародыши морских ежей выделяют в окружающую воду химические факторы, обладающие определенной биологической активностью (см., например, Brachet, Aimi, 1972; Vacquier et al., 1973; Бузников и др., 1973). Эти факторы могут изменять чувствительность зародышей к некоторым внешним воздействиям.

г. При определении густоты суспензии яйцеклеток или зародышей ее перемешивают, быстро берут определенный объем (например, 0,1 мл), разводят его морской водой до 25—100 мл и просчитывают количество зародышей в 0,1 мл полученной жидкой суспензии. Этот подсчет можно делать непосредственно в микропипетке или на предметном стекле, помещенном на темный фон, невооруженным глазом или с помощью наlobной лупы. Описанный способ, благодаря своей простоте, скорости и точности, является общепринятым.

д. При количественном взятии яйцеклеток и зародышей морских ежей суспензию надо тщательно перемешивать. Для этой цели удобны автоматические шплетки и дозаторы различных конструкций, позволяющие перемешивать суспензию в момент взятия аликвоты.

НОРМАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ

Общая характеристика

Нормальное зародышевое развитие морских ежей подробно рассмотрено в целом ряде монографий и обзорных статей (см., например, Harvey, 1956; Gustafson, Wolpert, 1967; Hinegardner, 1967; Gustafson, 1969; Hörstadius, 1973). Здесь же мы ограничимся необходимыми краткими сведениями, почерпнутыми из этих фундаментальных работ.

Организация зрелого яйца морского ежа была исследована в классических работах Гёрстадиуса (1935, 1939); результаты этих работ, дополненные материалами других авторов, суммированы в рис. 67. Напомним еще раз, что у рассматриваемых видов, как и вообще у большинства морских ежей, яйцеклетки не имеют морфологически выраженной

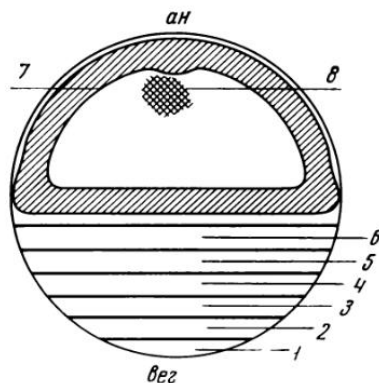
полярности; положение анимально-вегетативной оси выявляется только после активации яйцеклеток (Harvey, 1956; Hörstadius, 1973).

Дробление у морских ежей полное, радиальное и до стадии 8 бластомеров равномерное. У рассматриваемых видов, как и у большинства морских ежей, десинхронизация делений дробления начинается с пятого, хотя первые признаки ее появляются и раньше (очень кратковременное существование стадии 12 бластомеров). Первые два дробления проходят во взаимно перпендикулярных меридиональных плоскостях, а третье —

Рис. 67. Схематическая карта презумптивных областей яйца морского ежа. Экстраполировано на основании результатов Герстадиуса по витальной окраске (по Gustafson, Wolpert, 1967)

Обозначения:

- ан — анимальный полюс,
- veg — вегетативный полюс,
- 1 — первичная мезенхима,
- 2 — вторичная мезенхима,
- 3 — целом,
- 4 — глотка,
- 5 — желудок,
- 6 — проктодеум,
- 7 — эктодерма,
- 8 — стомодеум



в экваториальной плоскости; возникшие в результате этих делений дробления 8 бластомеров, как правило, морфологически неотличимы. Плоскости четвертого деления дробления в анимальном полушарии зародыша меридиональны; в итоге образуется 8 мезомеров. В вегетативном полушарии эти плоскости проходят под некоторым углом к экваториальной и направлены от анимально-вегетативной оси книзу; в итоге образуются 4 макромера и на вегетативном полюсе зародыша — 4 микромера. Микромеры заметны среди остальных клеток зародыша и на стадиях 32—64 бластомеров; на стадиях ранней и средней бластулы морфологические признаки полярности зародыша исчезают.

У некоторых видов морских ежей (например, у *Lytechinus variegatus* — Hinegardner, 1967) митотический аппарат клеток во время первых делений дробления доступен для прижизненных наблюдений без применения каких-либо специальных методов. У рассматриваемых видов во время профазы первого деления дробления хорошо заметна так называемая полоска — структура, лишенная видимой зернистости и четко контрастирующая с зернистой цитоплазмой. «Полоска» расположена в экваториальной плоскости зародыша и топографически совпадает с митотическим аппаратом. С растворением ядерной оболочки «полоска» утрачивает четкость контуров и расширяется, на анафазе-телофазе приобретает гантелеобразную форму. Аналогичные картины заметны, хотя несколько хуже, и во время второго митотического цикла.

Уже на стадии 16 бластомеров зародыши имеют бластоцель, увеличивающийся в ходе последующих несинхронных делений дробления. Нарастание числа клеток при формировании бластулы идет почти экспоненциально; темпы клеточных делений несколько ослабевают незадолго до

вылупления и резко замедляются на стадиях поздней бластулы — гаструлы (рис. 68).

На стадии средней бластулы, незадолго до вылупления, у всех клеток зародыша формируются реснички, и он начинает двигаться внутри оболочки. Вскоре после вылупления вегетативная сторона зародыша уплощается и утолщается, вследствие чего он утрачивает сферическую форму; на анимальном полюсе подвижные реснички заменяются пучком более длинных неподвижных (так называемый апикальный пучок). Несколько позже в бластоцель из вегетативной стенки бластулы мигрируют клетки первичной мезенхимы, происходящие из материала микромеров (мезенхимная бластула). Еще позже происходит инвагинация вегетативной стенки бластулы с образованием первичной кишки, или архентерона (стадия гаструлы). Архентерон растет через бластоцель по направлению к анимальному полюсу.

Несколько позже анимальная стенка уплощается; конец архентерона приближается к ее внутренней поверхности; из этого участка архентерона в бластоцель мигрируют клетки вторичной мезенхимы. В клетках первичной мезенхимы закладываются элементы личиночного скелета (спикулы), формируются вентральный и оральный пояса эктодермальных ресничек, появляются первые признаки дифференцировки архентерона. В итоге образуется билатерально симметричная личинка (призма).

В ходе дальнейшего развития ветви скелетных спикул входят в контакт с определенными участками эктодермы и индуцируют образование выростов — так называемых рук. Сначала формируется пара анальных рук, затем пара оральных рук. С появлением закладки первой пары рук личинку морского ежа именуют плутеусом, или эхиноплутеусом.

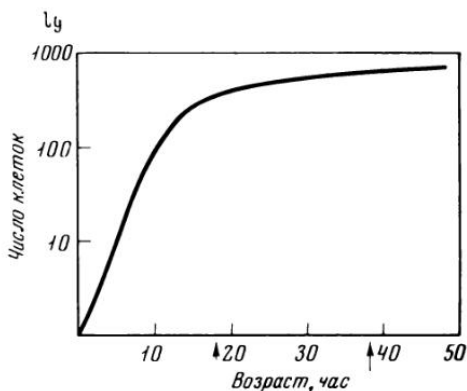


Рис. 68. Изменение числа клеток по ходу раннего зародышевого развития морского ежа *S. purpuratus* при 15° (Hinegardner, 1967). Стрелками обозначены моменты вылупления и начала гаструляции

Часть клеток вторичной мезенхимы превращается в пигментные клетки, с возникновением которых цвет личинок резко изменяется (что хорошо заметно невооруженным глазом при инкубации густой суспензии личинок). В эктодерме, в поясах реснитчатых клеток, появляются первые нейроны. Происходит дифференциация пищеварительного тракта и возникает ротовое отверстие, после чего личинки переходят к активному питанию.

Схематическое изображение плутеуса морского ежа дано на рис. 69. Развитие питающихся плутеусов и метаморфоз у рассматриваемых видов не изучено. Для ориентировки укажем, что у *Arbacia punctulata* интер-

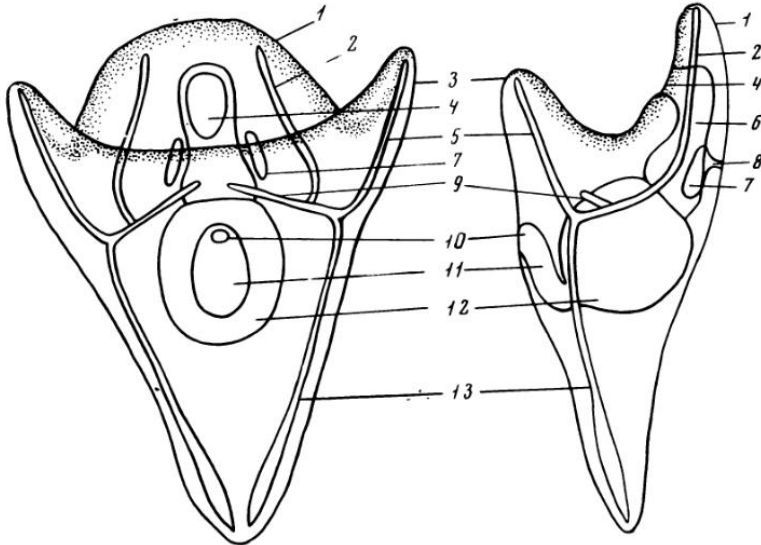


Рис. 69. Ранний эхиноплутеус (по Hörstadius, 1973)

1 — оральная лопасть; 2 — оральная скелетная палочка; 3 — анальная рука; 4 — рот; 5 — анальная скелетная палочка; 6 — пищевод; 7 — левый целомический мешок; 8 — гидропор; 9 — вентральная поперечная скелетная палочка; 10 — анальное отверстие; 11 — кишечник; 12 — желудок; 13 — скелетная палочка тела

вал между началом активного питания и метаморфозом составляет при 23° около 33 суток, в то время как от осеменения до начала активного питания проходит всего 48 час. (Harvey, 1956).

В заключение этого раздела отметим, что интенсивность макромолекулярных синтезов в зрелых неоплодотворенных яйцеклетках морских ежей невысока. После осеменения эти синтезы резко интенсифицируются (Gross, 1964; Olsson, 1966; Black et al., 1967; Epel, 1967; Mackintosh, Bell, 1969; Czihak, 1970; Mano, 1970; Hartmann et al., 1971; Zeitz et al., 1971).

Усиление биосинтеза белков происходит у *S. dröbachiensis* при 8° через 18 ± 2 мин. после осеменения, а у *S. intermedius* — при 18° через 12 ± 1 мин. (Бузников и др., 1971); по времени это совпадает с появлением заметного гялинового слоя. Биосинтез РНК у зародышей различных видов морских ежей интенсифицируется приблизительно в те же сроки, но достигает значительной величины лишь при переходе от 8 к 16 blastomeres; на стадии 16 blastomeres он происходит практически только в микромерах (Czihak, 1965; Czihak, Hörstadius, 1970). Достоверный синтез ДНК начинается после слияния пронуклеусов; в ходе формирования бластулы он заметно усиливается (Gross, 1964; Black et al., 1967).

Описание стадий нормального развития

Характеристика строения зародышей морских ежей на последовательных стадиях развития, в общем, совпадает для всех исследованных видов, если не считать таких подробностей, как абсолютные размеры, характер пиг-

Таблица 14

Краткое описание признаков основных стадий развития морских ежей

Стадия	Основные признаки
1	Неоплодотворенное яйцо
1а	Оплодотворенное яйцо; сформированная оболочка оплодотворения
1б	Оплодотворенное яйцо; сформированный гиалиновый слой
2а	Стадия узкой «полоски» (профаза первого деления дробления)
2б	Стадия широкой и гантелеобразной «полоски» (метафаза — телофаза первого деления дробления)
3	2 бластомера. В случае надобности, на основании прижизненного просмотра можно выделить стадии 3а (узкая «полоска» второго деления дробления) и 3б (широкая «полоска» второго деления дробления)
4	4 бластомера
5	8 бластомеров
6	16 бластомеров. Завершение периода синхронных делений дробления
7	32 бластомера. Микромеры еще отчетливо заметны среди других бластомеров
8	Ранняя бластула 1. Бластомеры сохраняют округлую форму; микромеры уже не выделяются среди них.
9	Ранняя бластула 2. Бластомеры частично утратили округлую форму (особенно со стороны бластоцеля). Диаметр бластоцеля равен около 0,65 диаметра зародыша (без оболочки оплодотворения)
10	Средняя бластула 1. Бластомеры утратили округлую форму, и контур зародыша в оптическом разрезе представляет относительно правильную окружность. Формирование ресничек, хорошо заметных в фазовом контрасте. Относительный диаметр бластоцеля 0,7—0,75
11	Средняя бластула 2. Вылупление. Зародыши подвижны и сохраняют сферическую форму; толщина стенок бластоцеля всюду одинакова. Относительный диаметр бластоцеля 0,8
12	Поздняя бластула 1. Стенка бластулы на вегетативном полюсе несколько уплощена и утолщена, зародыш слегка удлинен по анимально-вегетативной оси. В бластоцеле у вегетативного полюса появились единичные клетки первичной мезенхимы
13	Поздняя бластула 2 (мезенхимная бластула). Вегетативная стенка бластулы сильно уплощена. Большое количество клеток первичной мезенхимы в бластоцеле
14	Ранняя гастрюла 1. Начало инвагинации вегетативной стенки зародыша; у вегетативного полюса виден зачаток бластопора. Единичные клетки первичной мезенхимы мигрируют к анимальному полюсу
15	Ранняя гастрюла 2. Появление зачатка первичной кишки (архентерона) и массовая миграция клеток первичной мезенхимы к анимальному полюсу
16	Средняя гастрюла 1. Архентерон доходит приблизительно до центра бластоцеля
17	Средняя гастрюла 2. Архентерон достиг окончательных размеров, но еще не контактирует со стенкой личинки в области будущего ротового отверстия (отсутствие орального контакта). Личинка сохраняет радиально-симметричное строение
18	Поздняя гастрюла 1. Возникновение орального контакта и связанное с этим появление первых признаков двусторонней симметрии. Возникновение вторичной мезенхимы и начало формирования эктодермальных поясов ресничек

Таблица 14 (окончание)

Стадия	Основные признаки
19	Поздняя гастрюла 2. Анимальная стенка личинки уплощена; архентерон смещен от центральной оси личинки в сторону орального контакта. Начало скелетообразования (появление двух симметрично расположенных скелетных спикул)
20	Призма 1. Личинки утрачивают округлую и принимают характерную угловатую форму. Первые признаки дифференцировки пищеварительного тракта
21	Призма 2. Пищеварительный тракт состоит из слабо разграниченных закладок пищевода, желудка и кишки и изогнут на границе между пищеводом и желудком. Хорошо заметны проктодеум (углубление эктодермы на месте будущего ротового отверстия) и элементы личиночного скелета
22	Ранний плутеус 1. Возникло ротовое отверстие, по обе стороны от него (в оптическом разрезе) хорошо заметна парная закладка целома. Появились хроматофоры. Есть маленькая закладка первой пары рук (анальной, или вентральной)
23	Ранний плутеус 2. Отделы пищеварительного тракта разграничены четкими перехватами; сильно увеличился желудок. Скелетные палочки тела доходят до апекса (см. схему на рис. 69). Закладки анальной (вентральной) пары рук по-прежнему невелики
24	Ранний плутеус 3. Первая пара рук заметно увеличилась; появилась закладка второй пары (оральной, или дорсальной). Именно на этой стадии резко изменяется цвет суспензии личинок. См. схему плутеуса (рис. 69)
25	Средний плутеус 1. Развита обе пары рук
26	Средний плутеус 2. Переход к активному питанию

ментации, строение личиночного скелета и т. п. (Harvey, 1956; Hinegardner, 1967). Поэтому мы могли бы воспользоваться для рассматриваемых видов любой из имеющихся в литературе таблиц развития морских ежей (Harvey, 1956; Hinegardner, 1967; Müller et al. 1971; Stephens, 1972; Hörstadius, 1973, и др.), одна из которых, кстати сказать, разработана для *S. dröbachiensis*. Однако на основании многолетнего опыта работы на зародышах морских ежей было сочтено необходимым дать более подробную, чем в этих таблицах, классификацию стадий, соответствующих бластуляции и гастрюляции. Кроме того, вслед за Гарвей (1956) и в отличие от других цитированных авторов, мы выделили стадию «полоски» при первом делении дробления. Сроки наступления этой стадии являются хорошим дополнительным критерием при оценке результатов пробного осеменения. Предлагаемая классификация стадий развития, в свою очередь, приложима не только к рассматриваемым видам, но и к другим видам морских ежей. При описании нормального развития мы ограничиваемся периодом от осеменения до начала активного питания (табл. 14).

В табл. 15 (*S. intermedius* и *S. dröbachiensis*) приведены сроки наступления этих стадий при различных температурах, а в табл. XVII—XVIII (*S. intermedius*), XIX—XX (*S. dröbachiensis*) даны фотографии зародышей и личинок на соответственных стадиях развития. Номера фотографий в этих таблицах соответствуют номерам стадий развития.

Таблица 15
Стадии развития морских ежей и время их наступления от осеменения при различных температурах

Номер стадии	Стадия	S. intermedius				S. dröbachiensis		
		15°		20°		0°	4°	8°
		часы, минуты	τ_p/τ_0	часы, минуты	τ_p/τ_0	сутки,	минуты	минуты
1а	Оболочка оплодотворения	45 сек.	—	30 сек.	—	00.00.10	00.00.07	00.00.05
1б	Гиалиновый слой	00.30	—	00.20	—	00.03.20	00.02.00	00.01.15
2а	Узкая «полоска»	00.50	—	00.30	—	—	—	00.01.50*
2б	Широкая «полоска»	01.20	—	00.50	—	00.05.50	00.03.30	00.02.10
3	2 blastomera	01.45	1,9	01.07	1,8	00.08.30	00.05.10	00.03.10
4	4 blastomera	02.40	2,9	01.45	2,8	00.13.30	00.08.00	00.05.10*
5	8 blastomeres	03.35	3,8	02.23	3,8	00.17.00	00.10.30	00.07.00
6	16 blastomeres	04.32	4,9	03.00	4,7	00.23.00	00.14.00	00.08.30
7	32 blastomera	—	—	03.38	5,7	00.30.00	00.18.00	00.11.00
8	Ранняя blastula 1	—	—	04.20	6,8	—	—	00.14.00*
9	Ранняя blastula 2	07.48	8,6	05.13	8,2	—	—	00.17.00*
10	Средняя blastula 1	10.30	10,9	07.15	11,4	02.17.00	01.16.00	01.00.00
11	Средняя blastula 2 (выулнение)	14.00	15	09.30	15	03.08.00	02.02.00	01.06.00
12	Поздняя blastula 1	—	—	11.00	17,4	—	—	01.11.00*
13	Поздняя blastula 2	17.25	18,7	12.00	18,9	—	—	01.15.00*
14	Ранняя gastrula 1	23.00	24,6	15.45	24,9	05.00.00	03.03.00	01.21.00
15	Ранняя gastrula 2	—	—	17.00	26,8	—	—	02.03.30*
16	Средняя gastrula 1	27.00	28,9	18.25	29	07.00.00	04.04.00	02.12.00
17	Средняя gastrula 2	—	—	19.20	30,5	—	—	02.16.00*
18	Поздняя gastrula 1	—	—	20.25	32,2	—	—	02.19.30*
19	Поздняя gastrula 2	36.15	38,8	23.55	37,8	08.00.00	05.00.00	03.00.00
20	Призма 1	—	—	24.55	39,3	—	—	03.04.00*
21	Призма 2	42.00	45	27.25	43,3	10.00.00	06.12.00	03.20.00
22	Ранний pluteus 1	45.30	48,8	29.50	47,1	—	—	04.13.00*
23	Ранний pluteus 2	—	—	34.25	54,3	—	—	05.00.00
24	Ранний pluteus 3	58.00	62	39.35	62,5	14.00.00	08.00.00	07.00.00
25	Средний pluteus 1	—	—	~54.00	85,3	18.00.00	11.00.00	12.00.00
26	Средний pluteus 2	—	—	~84.00	132,6	30.00.00	20.00.00	12.00.00

Примечание. Развитие *S. intermedius* — ориг. данные Г. А. Бузисова и В. И. Подмарьва; сроки развития *S. dröbachiensis* при 0, 4 и 8° точно 8° взяты из работы Стивенса (Stephens, 1972). Звездочкой отмечены сроки, установленные при 8° по собственным данным.

S. intermedius. Описание нормального развития этого вида дается на основании собственных наблюдений. Они проводились при стабильных температурных условиях, поддерживаемых с помощью ультратермостата. Морфологическое состояние зародышей и личинок регистрировали посредством микрофотосъемки; при съемке подвижных личинок часть их обездвигивали формалином (конечная концентрация 0,2%). Наиболее подробно было изучено развитие при 20°: наблюдениями, продублированными на пяти партиях зародышей, был охвачен период в 48 час., начиная от момента осеменения. К концу периода наблюдений была достигнута стадия 24; о сроках наступления последующих стадий имеются приблизительные данные. От момента осеменения и до стадии 4 материал просматривали и фотографировали каждые 2 мин.; во время формирования 1 и 2-й борозд дробления этот интервал уменьшали до 1 мин. От стадии 4 до стадии 11 интервал между наблюдениями составлял 10 или 15 мин.; от стадии 11 до стадии 23 — 30 мин., а в течение последних 6 час. изученного периода — 60 мин.

Развитие *S. intermedius* при 15° было также прослежено от стадии 0 до стадии 24; интервалы наблюдений до стадии 4 составляли 2 мин. (две партии зародышей), а на более поздних стадиях — 30—90 мин. (одна партия зародышей и личинок). Эти результаты позволили установить сроки наступления перечисленных выше стадий развития (табл. 15) и получить серии микрофото зародышей и личинок *S. intermedius* на последовательных стадиях развития (табл. XVII—XVIII). За время перехода зародышей и личинок на очередную стадию развития принималось время, когда этот переход наблюдался у ~10% особей в изучаемой партии.

На основании полученных результатов были измерены также величины t_0 — единицы развития, равной продолжительности одного клеточного цикла в период синхронных делений дробления (Детлаф и Детлаф, 1960). У морских ежей представляется наиболее удобным измерять продолжительность второго клеточного цикла. По нашим данным эта продолжительность равна: при 20° — 38 мин. (5 измерений), при 15° — 56 мин. (2 измерения) и при 23,5° — 37 мин. (1 измерение). При 25° развитие резко нарушается; в частности, оказывается невозможным формирование нормальных плутеусов. Судя по результатам однократного измерения при 23,5°, эта температура уже не вполне оптимальна. Отметим, что развитие при этой температуре доходит до формирования плутеусов, но сопровождается некоторыми аномалиями во время делений дробления и при гаструляции.

Материалы, использованные для табл. 13 и 14 и табл. XVII—XVIII, были получены в августе-сентябре 1972 и 1973 гг. Морские ежи, примененные для получения половых продуктов, были собраны на сублиторали в районе островов Попова и Путятинна (залив Петра Великого).

→
Таблицы XVII—XX. Стадии развития морских ежей. Номера фотографий соответствуют номерам стадий развития

Табл. XVII. Стадии развития морского ежа *S. intermedius*

Стадии 26, 4, 7, 11 для *S. intermedius* отсутствуют (см. аналогичные для *S. dröbachiensis* в табл. XIX)

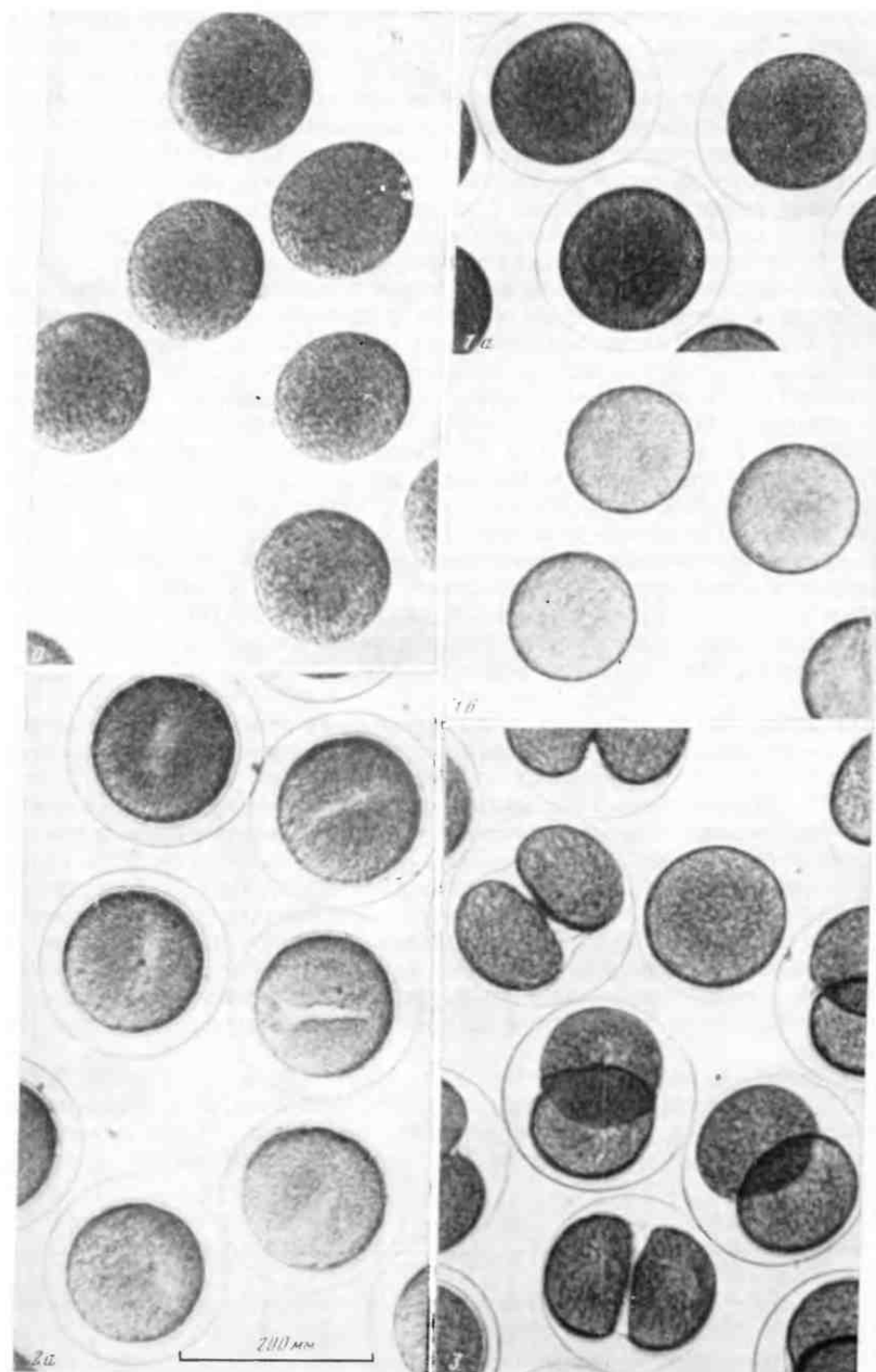
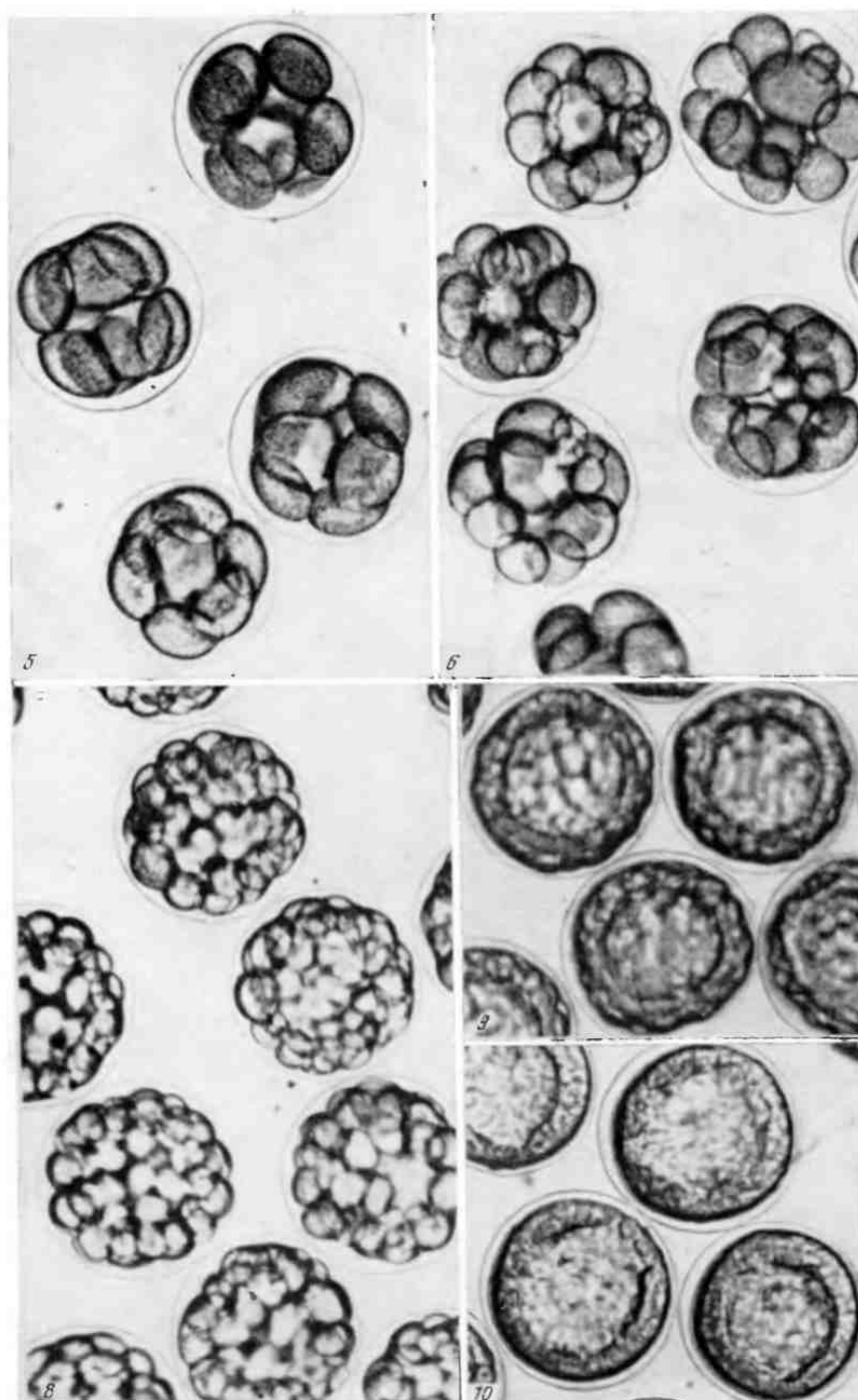
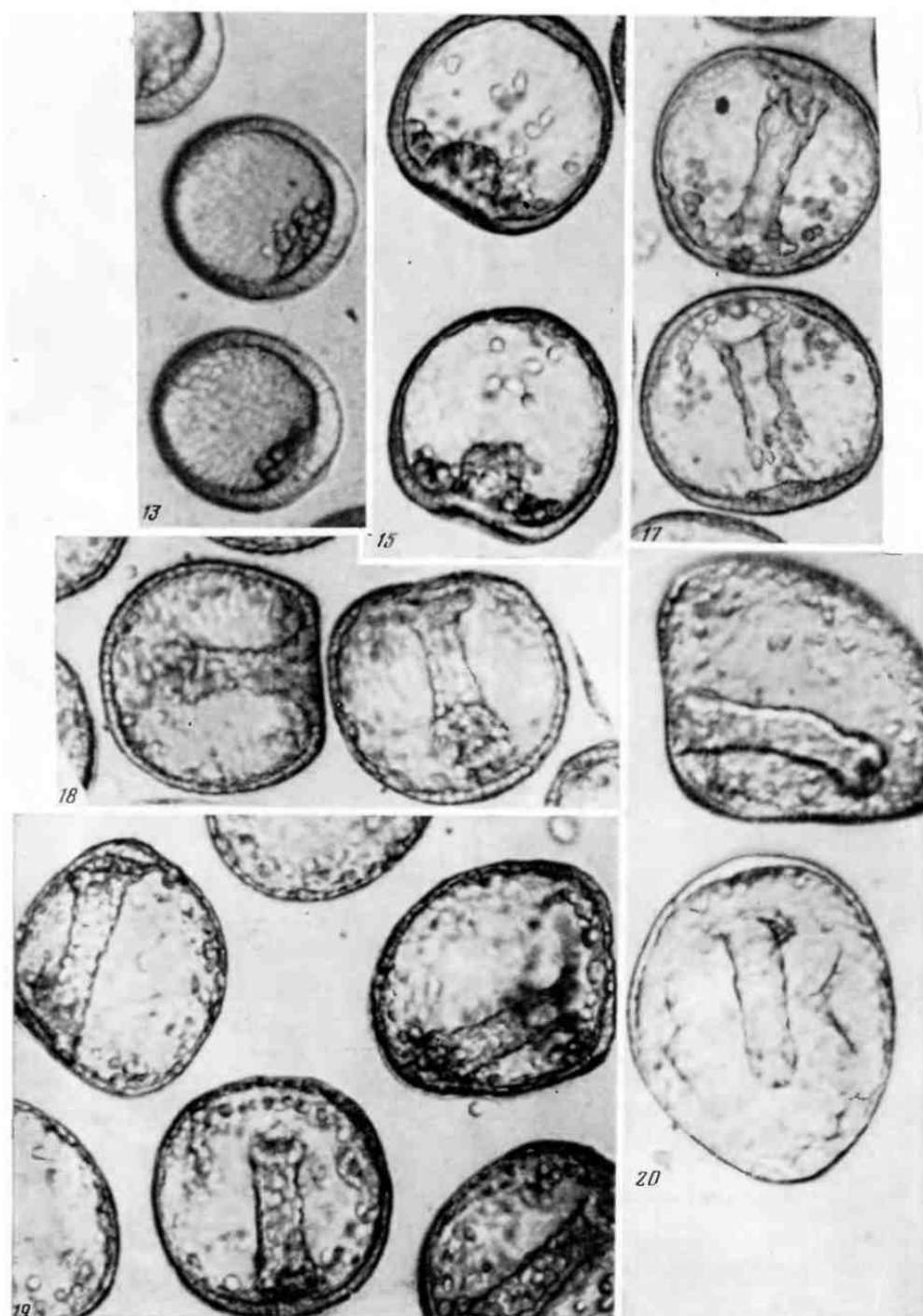


Таблица XVII





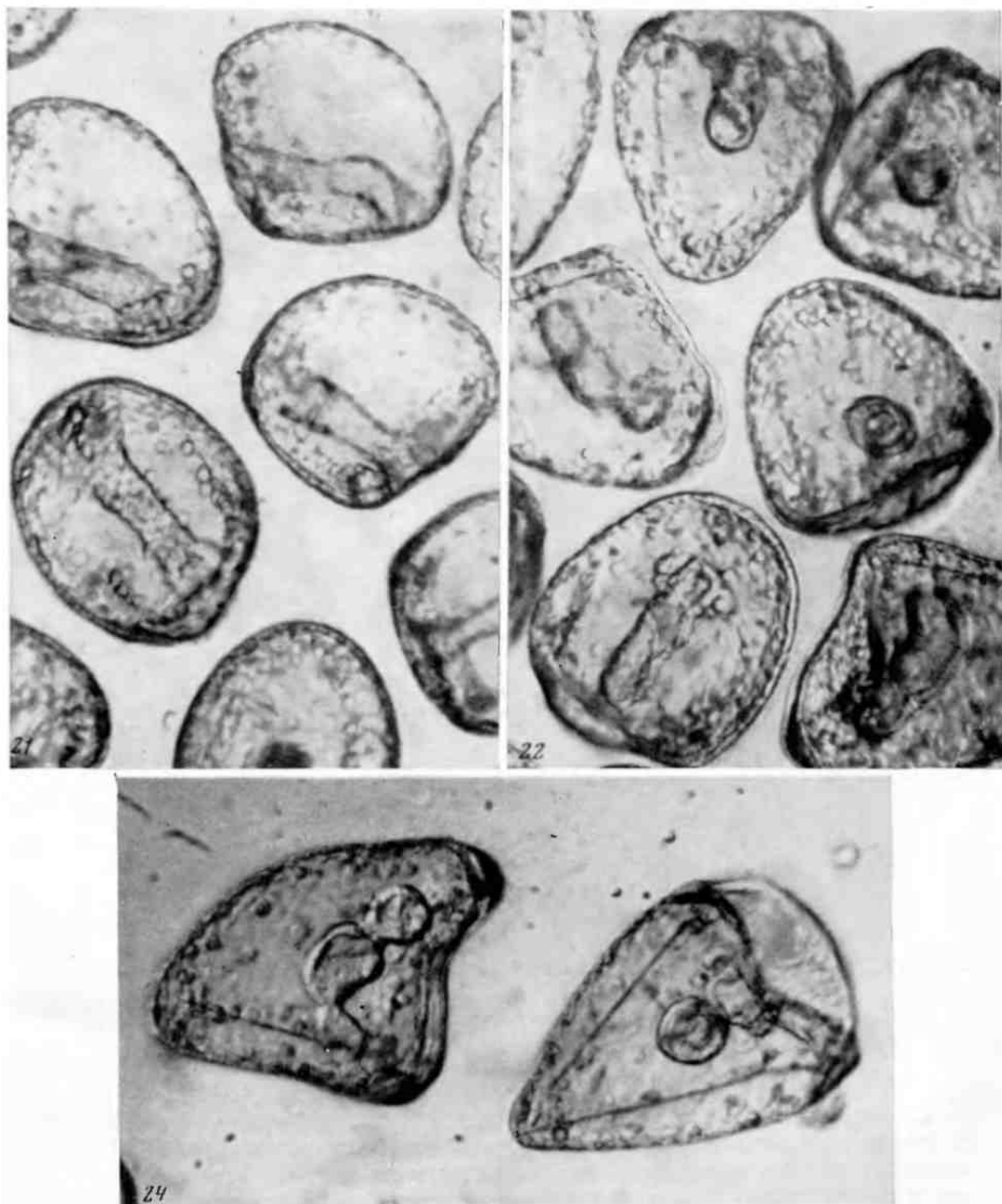


Табл. XVIII. Стадии развития морского ежа *S. intermedius*

Стадии 12, 14, 16, 23, 25 для *S. intermedius* отсутствуют (см. аналогичные стадии для *S. dröbachiensis* в табл. XIX—XX)

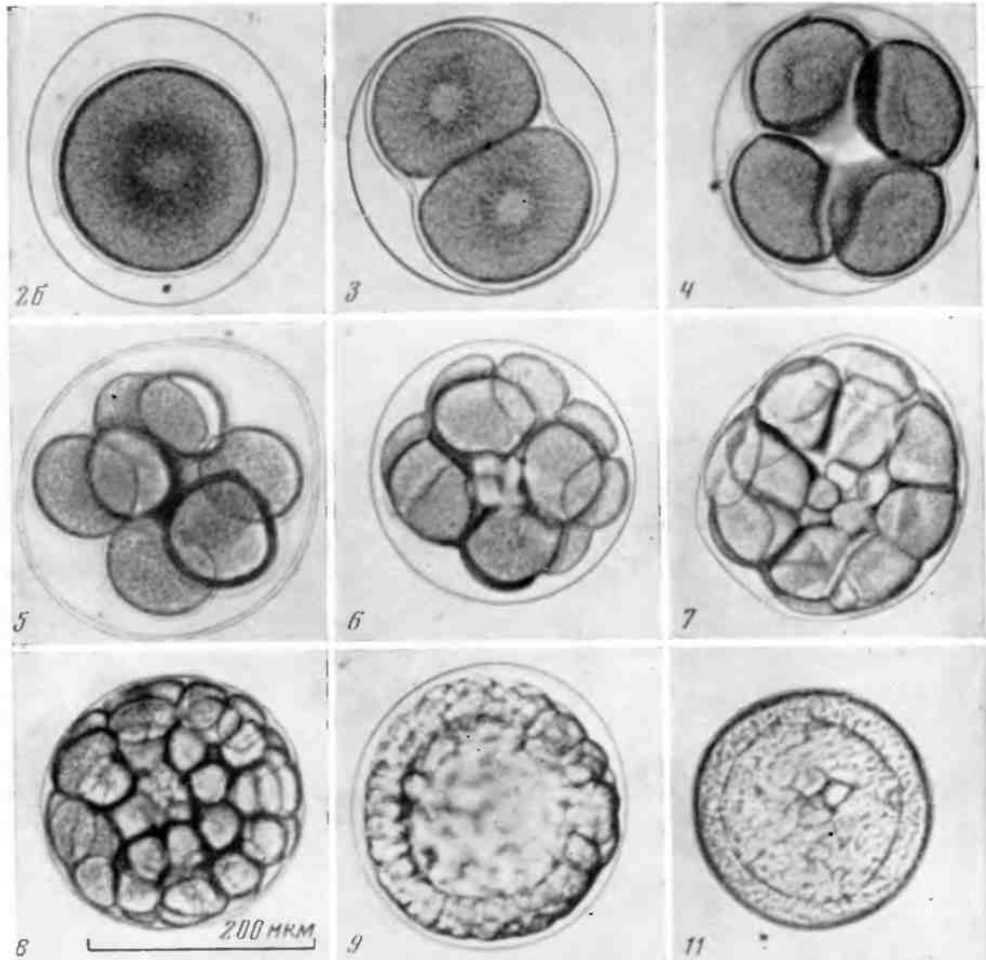


Табл. XIX. Стадии развития морского ежа *S. dröbachiensis*

Стадии 0, 1а, 1б, 2а, 10 для *S. dröbachiensis* отсутствуют (см. аналогичные микрофотографии) для *S. intermedius* в табл. XVII

В заключение отметим некоторые особенности, отличающие зародышей *S. intermedius* от зародышей двух других рассматриваемых видов. Яйцеклетки и ранние зародыши этого вида пигментированы несколько сильнее и имеют светло- или ярко-оранжевый цвет. С развитием хроматофоров цвет личинок становится красноватым или светло-лиловым. Для зародышей *S. intermedius* характерна несколько меньшая, чем у двух других видов, синхронность развития. Так, при 20° сроки завершения первого деления дробления у зародышей, полученных от одной самки, на ± 9 мин. отклоняются от средней величины, равной 75 мин.

S. dröbachiensis. Микрофото зародышей и личинок, находящихся на последовательных стадиях развития, даны на табл. XIX—XX

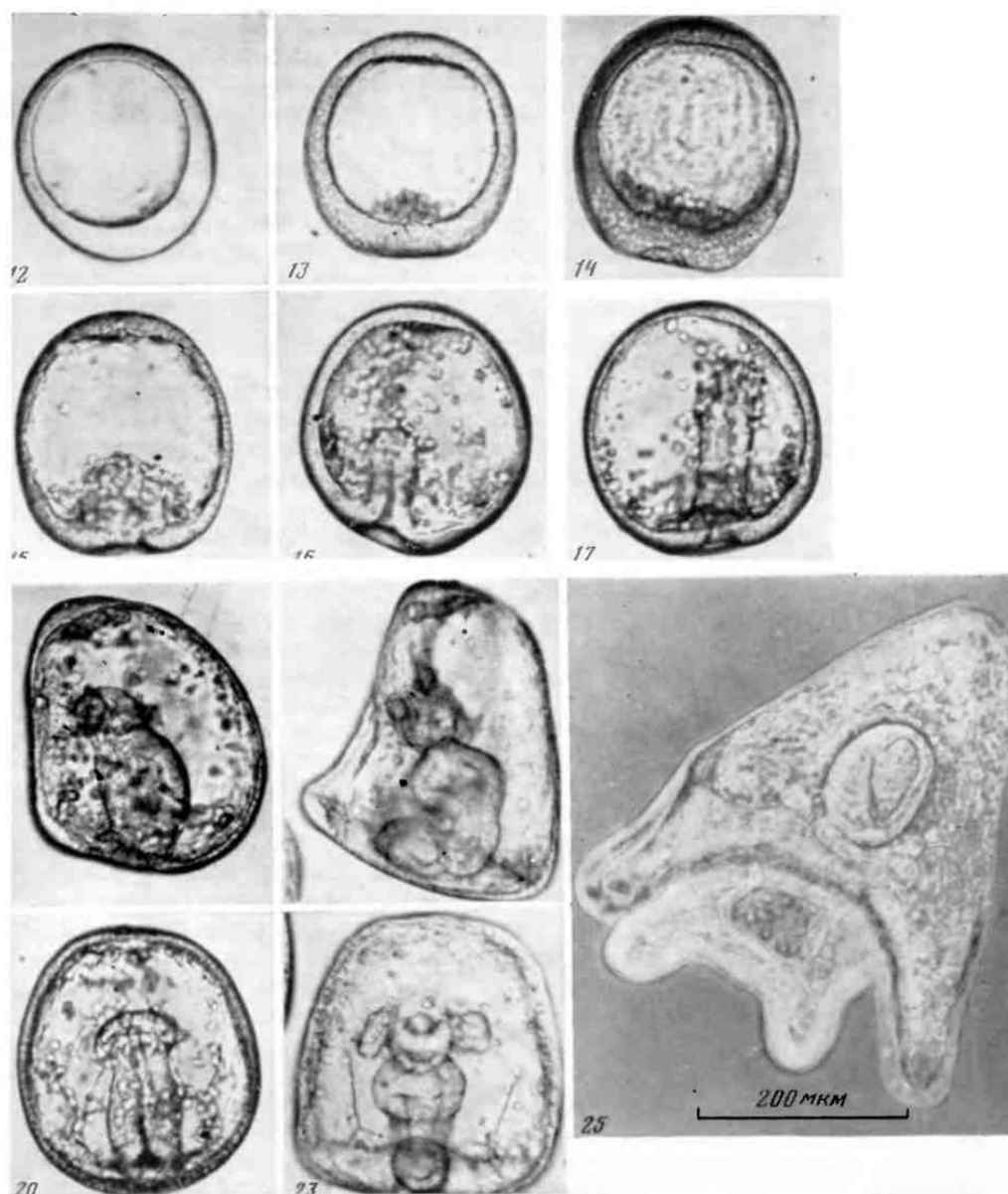


Табл. XX. Стадии развития морского ежа *S. dröbachiensis*

Стадии 18, 19, 21, 22, 24 для *S. dröbachiensis* отсутствуют (см. аналогичные микрофотографии для *S. intermedius* в табл. XVIII)

(по Бузникову и др., 1964); микрофото стадии 25 любезно предоставлено Стивенсом. Сроки наступления стадий развития даны в табл. 15, при составлении которой были использованы в основном данные Стивенса (1972), проводившего наблюдения при постоянной температуре инкубации (0, 4 или 8°).

Яйцеклетки и ранние зародыши *S. dröbachiensis* пигментированы слабо и имеют серовато-желтый или светло-желтый цвет. Цвет личинок, имеющих хроматофоры, приблизительно такой же, как и у остальных двух видов. Для *S. dröbachiensis* характерна высокая степень синхронности развития в партии зародышей от одной самки. Так, первое деление дробления наступает практически одновременно у 90% зародышей (при 8° первое деление дробления проходит в среднем через 190 мин. после осеменения с отклонением ± 5 мин.) (Stephens, 1972).

S. nudus. По размерам, внешнему виду и пигментации яйцеклеток, зародышей и личинок *S. nudus* очень похож на *S. dröbachiensis*. Отличается от *S. intermedius* большей синхронностью развития зародышей в пределах одной партии и большей требовательностью к условиям инкубации.

Развитие зародышей *S. nudus* идет при равных температурных условиях несколько быстрее, чем у *S. intermedius*. Сроки наступления отдельных стадий развития при постоянной температуре инкубации для *S. nudus* не определялись. Установлено лишь, что продолжительность второго клеточного цикла (τ_0) *S. nudus* при 20° равна 36 мин. Зная эту величину, можно приблизительно рассчитать время перехода к той или иной стадии при данной температуре инкубации (при условии, что известно выраженное в τ_0 время перехода к этой стадии у близких видов, в данном случае *S. intermedius* и *S. dröbachiensis*). Правомерность подобных расчетов подтверждается сопоставлением выраженных в τ_0 сроков наступления отдельных стадий развития у *S. intermedius* (наши данные), *S. dröbachiensis* и *Arbacia punctulata* (обработанные нами материалы Harvey, 1956; Stephens, 1972). Первое деление дробления происходит у всех этих видов через $1,7\tau_0$ после осеменения, соответственно совпадают и сроки прохождения последующих синхронных делений дробления. Вылупление у всех этих видов происходит через $15\tau_0$ после осеменения, гастрюляция начинается через $23-24\tau_0$, скелетные спикулы появляются через $37-38\tau_0$ и т. д.

ОБЫЧНЫЕ АНОМАЛИИ РАЗВИТИЯ

Сведения о некоторых типичных аномалиях развития могут оказаться полезными как для оценки используемого в работе материала и условий его инкубации, так и для анализа последствий экспериментального воздействия на развивающихся зародышей. Аномалии отхождения оболочки оплодотворения были рассмотрены выше, в разделе об искусственном осеменении.

а. Деформация зародышей незадолго до первого деления дробления обычно носит характер вмятин на поверхности клеток и свидетельствует о неоптимальной (слишком высокой) температуре инкубации.

б. Полиспермия проявляется в многополюсных митозах, аномальном преждевременном дроблении, неправильной ориентации бластомеров и т. д. Типичный признак — образование при первом делении дробления сразу трех-четырёх бластомеров. Может быть связана с исходной недоброкачественностью яйцеклеток, слишком долгим хранением их или ошибками в процедуре осеменения. Является частым следствием очень многих химических воздействий на яйцеклетки, проводимых до или во время осеменения (Harvey, 1956; Mateyko, 1967; Longo, Anderson, 1970).

в. Многоядерность яйцеклеток и бластомеров, не связанная с полиспермией, внешне отличается от многоядерности, вызванной полиспермией, нормальным характером и темпом митозов. Довольно часто встречается при работе с яйцеклетками, полученными в самом конце сезона размножения данного вида. Может быть следствием также самых разнообразных химических воздействий на оплодотворенные яйцеклетки (Harvey, 1956; Бердышева, Маркова, 1967; Бузников, 1967).

г. Аномалии, связанные с нарушением или отсутствием функциональных межклеточных связей во время первых делений дробления. Иногда у зародышей, находящихся на стадиях 2, 4 или (очень редко) 8 бластомеров, бластомеры начинают развиваться совершенно независимо друг от друга. В итоге из каждого бластомера образуется полноценный зародыш соответственно меньшего по сравнению с нормой размера; все зародыши, возникшие из одной и той же яйцеклетки (2, 4 или 8), остаются механически соединенными друг с другом. Значительно чаще такое разобщение бластомеров носит частичный характер и приводит к формированию бластул с более или менее выраженными перетяжками. Подобные аномалии возникают под влиянием некоторых специфических воздействий, нарушающих или блокирующих функциональные межклеточные связи (Harvey, 1956; Vacquier, Mazia, 1968). В то же время встречаются партии яйцеклеток, имеющих тенденцию к возникновению подобных аномалий. Эта тенденция реализуется у большого процента зародышей как под влиянием неблагоприятных условий инкубации, так и при самых разнообразных экспериментальных воздействиях, не имеющих прямого отношения к функциональным межклеточным связям. О мнимом характере подобных результатов свидетельствует присутствие хотя бы единичных зародышей со сходными аномалиями в контрольной группе зародышей.

д. Неправильная ориентация бластомеров, выражающаяся в формировании зародышей, имеющих вид сильно вытянутого прямоугольника, еще один пример аномалии, обусловленной исходными свойствами подопытных яйцеклеток и провоцируемой неспецифическими внешними воздействиями. Внешне такие зародыши похожи на зародышей, формирующихся из центрифугированных яйцеклеток (Harvey, 1956). Эта аномалия встречается довольно часто у *S. intermedius* и также может быть выявлена путем внимательного просмотра контрольной группы зародышей.

е. Остановка развития на стадии 10; зародыши во многих случаях долго (до нескольких суток — Harvey, 1956) сохраняют нормальный вид. Эта аномалия может быть следствием специфического выключения функции клеточных ядер (Gross, 1964), но может также наблюдаться и при исходной недоброкачественности половых продуктов (в частности, при осеменении поврежденной спермой) и при слишком низкой температуре инкубации.

ж. Образование микромеров в ходе третьего деления дробления (в норме они образуются при четвертом делении) (Dan, Ikeda, 1971). Тенденция к этой аномалии, как и к ряду предыдущих, может быть свойственна некоторым партиям яйцеклеток и проявляться при различных неспецифических воздействиях.

з. Деагрегация бластомеров вскоре после вылупления довольно обычна в случаях, когда при инкубации густых суспензий зародышей не производят смену воды после вылупления.

п. Различные нарушения гастрюляции (торможение образования архентерона, экзогастрюляции и т. д.) могут быть следствием специфических химических воздействий (например, при ашмализации и вегетализации зародышей — Hörstadius, 1973), но могут также возникать при нарушениях условий инкубации и особенно у исходно предрасположенных к этим аномалиям зародышей.

Возможные при работе с зародышами морских ежей аномалии развития, разумеется, не исчерпываются рассмотренным списком. В то же время необходимо еще раз подчеркнуть, что при соблюдении оптимальных условий инкубации и использовании для работы доброкачественного материала неконтролируемые отклонения развития морских ежей от нормы исключительно редки.

Литература

- Бердышева Л. В., Маркова Л. Н. 1967. Цитологический анализ действия холино-, адreno- и серотонинолитиков на оплодотворенные яйцеклетки морского ежа.— Цитология, 9, 8, 912—921.
- Бузников Г. А. 1967. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М., «Наука».
- Бузников Г. А., Манухин Б. Н., Подмарев В. И. 1971. Влияние серотонина на активацию белкового синтеза в яйцеклетках морских ежей после оплодотворения.— Докл. АН СССР, 200, 5, 1254—1256.
- Бузников Г. А., Ракич Л., Турнаев Т. М. 1972. О сверхчувствительности ранних эмбрионов морского ежа *Arbacia lixula* к нейрофармакологическим препаратам.— Журн. эвол. биохим. фиол., 8, 5, 478—485.
- Бузников Г. А., Звездина Н. Д., Проказова Н. В., Бергельсон Л. Д., Турнаев Т. М. 1973. Влияние ганглиозидов на чувствительность эмбриональных клеток к нейрофармакологическим препаратам.— Докл. АН СССР, 210, 6, 213—215.
- Гаевская Н. С. (Ред.) 1948. Определитель фауны и флоры северных морей СССР. М., «Советская наука».
- Гинзбург А. С. 1968. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М., «Наука».
- Гнездилова С. М. 1971. Морфологическая и цитохимическая характеристика оогенеза и половых циклов у морских ежей *Strongylocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius*. Владивосток. Автореф. канд. дисс.
- Детлаф Т. А., Детлаф А. А. 1960. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии.— Докл. АН СССР, 134, 1, 199—202.
- Евдокимов В. В. 1973. Экспериментальная регуляция гаметогенеза у морских ежей. Владивосток. Автореф. канд. дисс.
- Озернюк Н. Д. 1974. Химические методы выделения ооцитов из яичника и освобождения ооцитов от фолликулярных оболочек. В кн. «Методы биологии развития» (Под ред. Детлаф Т. А., Бродского В. Я., Гаузе Г. Г.). М., «Наука».
- Павловский Е. Н. (Ред.) 1955. Атлас беспозвоночных дальневосточных морей СССР. М.—Л., Изд-во АН СССР.
- Berg W. E. 1967. Some experimental techniques for eggs and embryos of marine invertebrates.— In: Methods in developmental biology. Wilt F. H., Wessels N. K., Crowell T. Y. (Eds), 767—776.
- Black R. E., Baptist E., Piland J. 1967. Puromycin and cycloheximide inhibition of thymidine incorporation into DNA of cleaving sea urchin eggs.— Expt. Cell Res., 48, 2, 431—439.
- Bracht J., Aimi J. 1972. Effects of conditioned media on sea urchin egg development.— Exper. Cell Res., 72, 1, 46—55.

- Burchill B. R., Blomquist C. H. 1969. Removal of fertilization membranes from sea urchin.—*Experientia*, 25, 5, 540—541.
- Buznikov G. A., Chudakova I. V., Zvezdina N. D. [Бузников Г. А., Чудакова И. В., Звездина Н. Д.]. 1964. The role of neurohumours in early embryogenesis. I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach.—*J. Embryol. exp. Morph.*, 12, 563—573.
- Costello D. P., Davidson M. E., Eggers A., Fox M. H., Henley C. 1957. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Marine Biol., Lab., USA, Wood Hole.*
- Czihak G. 1965. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Echiniden Ribonucleinsäure-Synthese in den Mikromeren und Entodermdifferentierung. Ein Beitrag zum Problem der Induction.—*Roux Arch. Entwicklungsmech Organismen*, 156, 4, 504—524.
- Czihak G. (ed.). 1973. The sea urchin embryo. *Biochemistry and morphogenesis*. N. Y.—London—Heidelberg, Springer.
- Czihak G., Hörstadius S. 1970. Transplantation of RNA-labelled micromeres into animal halves of sea urchin embryos. A contribution to the problem of embryonic induction.—*Develop. Biol.*, 22, 1, 15—30.
- Czihak G., Pohü E. 1970. DNS synthese in frühen Furchungsstadien von Seeigembryonen.—*Z. Naturforsch.*, 25b, 9, 1047—1052.
- Dan K., Ikeda M. 1971. On the system controlling the time of micromer formation in sea urchin embryos.—*Developm. Growth. Differ.*, 13, 4, 285—302.
- Epel D. 1967. Protein synthesis in sea urchin eggs: a «late» response to fertilization.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 4, 899—906.
- Epel D. 1970. Methods for removal of the vitelline membrane of sea urchin eggs. II. Controlled exposure to trypsin to eliminate post-fertilization clumping of embryos.—*Exper. Cell Res.*, 61, 1, 69—70.
- Epel D., Weaver A. M., Mazia D. 1970. Methods for removal of the vitelline membrane of sea urchin eggs. I. Use of dithiothreitol (Cleland reagent).—*Exper. Cell Res.*, 61, 1, 64—68.
- Giudice G. 1973. Developmental biology of the sea urchin embryo. N. Y.—London, Acad. Press, p. 496.
- Giudice G., Mutolo V. 1970. Reaggregation of dissociated cells of sea urchin embryos.—*Adv. Morphogen.*, 8, 115—158.
- Giudice G., Sconzo G., Bono A., Albanese J. 1972. Studies on sea urchin oocytes. I. Purification and cell fractionation.—*Exper. Cell Res.*, 72, 1, 90—94.
- Gross P. S. 1964. The immediacy of genomic control during early development.—*J. Exper. Zool.*, 157, 1, 21—41.
- Gustafson T. 1969. Cell recognition and cell contacts during sea urchin development.—In: «Cellular recognitions». Smith R. T., Good R. A. (eds.). Mexico, Meredith Corp., p. 47—60.
- Gustafson T., Toneby M., 1970. On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis.—*Exper. Cell Res.*, 62, 1, 102—117.
- Gustafson T., Toneby M. 1971. How genes control morphogenesis. The role of serotonin and acetylcholine in morphogenesis.—*Amer. Scientist*, 59, 4, 452—462.
- Gustafson T., Wolpert L. 1967. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis.—*Biol. Rev.*, 42, 3, 442—498.
- Hagström B. E., Lönning S. 1973. The sea urchin egg as a testing object in toxicology.—*Acta pharmacol. et toxicol.*, 32, Suppl. 1.
- Hartmann J. F., Ziegler M. M., Comb D. G. 1971. Sea urchin embryogenesis. I. RNA synthesis by cytoplasmic and nuclear genes during development.—*Developm. Biol.*, 25, 2, 209—231.
- Harvey E. B. 1956. The American Arbacia and other sea urchins. Princeton Univ. Press.
- Hinegardner R. T. 1967. Echinoderms. In: *Methods in developmental Biology*. Wilt. F. H., Wessels N. K. (Eds.). T. Y. Crowell, p. 139—155.
- Hinegardner R. T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin.—*Biol. Bull.*, 137, 3, 465—475.
- Hörstadius S. 1935. Über die Determination in der Eiachse bei Seeigeln.—*Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 14, 251—429.
- Hörstadius S. 1939. The mechanics of sea urchin development studied by operative methods.—*Biol. Rev.*, 14, 139—179.
- Hörstadius S. 1973. Experimental embryology of echinoderms. Oxford, Clarendon Press.
- Hynes R. O., Gross P. R. 1970. A method for separating cells from early sea urchin embryos.—*Developm. Biol.*, 21, 3, 383—402.
- Longo F. J., Anderson E. 1970. The effects of nicotine on fertilization in the sea urchin, *Arbacia punctulata*.—*J. Cell Biol.*, 46, 2, 308—325.
- Mackintosh F. R., Bell E. 1969. Proteins synthesized before and after fertilization in sea urchin eggs.—*Science*, 164, 3882, 961—962.

- Mano J.* 1970. Cytoplasmic regulation and cyclic variation in protein synthesis in the early cleavage stage of the sea urchin embryo.— *Developm. Biol.* **22**, 3, 433—460.
- Mateyko G. M.* 1967. Developmental modifications in *Arbacia punctulata* by various metabolic substances.— *Biol. Bull.*, **131**, 1, 184—228.
- Mertes D. H., Berg W. E.* 1962. Prolongation of the life span of unfertilized sea urchin eggs with antibiotics and sulfonamides.— *Acta embryol. et morphol. exper.*, **5**, 3, 280—284.
- Müller W. E., Forster W., Zahn G., Zahn R. K.* 1971. Morphologische und biochemische Charakterisierung der Entwicklung befruchteter Eier von *Sphaerechinus granularis*. I. Aufzucht, Morphologie und elektronische Stadienbestimmung.— *Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen*, **167**, 2, 99—117.
- Olsson O. A. T.* 1966. The ribonucleic acid metabolism during the one-cell stage of the sea urchin development.— *Compar. Biochem. and Physiol.*, **17**, 2, 501—507.
- Reverberi G. (Ed).* Experimental embryology of marine and fresh-water invertebrates. 1971. American Elsevier, N. Y., 570 p.
- Runnström J.* 1966. The vitelline membrane and cortical particles in sea urchin eggs and their function in maturation and fertilization.— *Advanc. Morphogen.*, **5**, 222—325.
- Stephens R. S.* 1972. Studies on the development of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. I. Ecology and normal development.— *Biol. Bull.*, **142**, 1, 132—144.
- Tyler A., Tyler B. S.* 1966. The gametes; some procedures and properties. Physiology of fertilization and early development.— In: «Physiology of Echinodermata». Booloootian R. A. (Ed.). N. Y., J. Wiley and Sons, Inc., Interscience Publ., p. 639—741.
- Vacquier V D., Mazia D.* 1968. Twinning of sand dollar embryos by means of dithiothreitol. The structural basis of blastomere interactions.— *Exper. Cell Res.*, **52**, 1, 209—221.
- Vacquier V D., Terner M. J., Epel D.* 1973. Protease released from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy.— *Exper. Cell Res.*, **80**, 1, 111—119.
- Zeitz L., Garfinkel E., Ferguson R.* 1971. The time course of DNA synthesis in the early post-fertilization sea urchin egg. A reevaluation based on uptake of ³H-bromodeoxyuridine.— *Cytobios*, **4**, 14, 129—144.