

УДК 595.123:591.3

## ОСОБЕННОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ПЛАНАРИИ *DUGESIA LUGUBRIS* (TURBELLARIA, TRICLADIDA)

Ю. П. Канана

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины,  
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина

Принято 26 августа 2009

**Особенности раннего эмбриогенеза планарии *Dugesia lugubris* (Turbellaria, Tricladida).** Канана Ю. П. — На датированном материале проведено изучение раннего эмбриогенеза планарии *Dugesia lugubris* O. Schmidt, 1861. Установлено, что в коконе *D. lugubris* первоначально имеется один тип желточных клеток — полигональные, а веретеновидные клетки образуются позже, вероятно, под действием группирующего фактора. Также установлено, что формирование эмбрионального эпителия и эмбриональной глотки идет параллельно.

**Ключевые слова:** эмбриогенез, турбеллярии, планарии, желточные клетки, раннее дробление, эмбриональный эпителий.

**Early Embryogenesis Peculiarities of the Planarian *Dugesia lugubris* (Turbellaria, Tricladida).** Kanana Yu. P. — Early embryogenesis of the planarian *Dugesia lugubris* O. Schmidt, 1861 on the dated material is studied. The polygonal type of yolk cells is shown to be the only type initially existing in the cocoon of *D. lugubris*, and fusiform cells are formed later, probably, influenced by grouping factor. It is also found that the embryonic epithelium and embryonic pharynx are formed simultaneously.

**Key words:** embryogenesis, turbellaria, planarian, yolk cells, early cleavage, embryonic epithelium.

### Введение

Проблема эмбрионального развития триклад рассматривается во многих работах (Metschnikoff, 1883; Iijima, 1884; Bardeen, 1902; Mattiesen, 1904; Stevens, 1904; Fulinski, 1916; Seilern-Aspang, 1958; Le Moigne, 1963; Koscielski, 1966; Sakurai, 1991; Tekaya et al., 1999; Cardona et al., 2006 и др.). Тем не менее некоторые данные авторов являются противоречивыми. Так, по мнению Ф. Зайлерн-Аспанг (Seilern-Aspang, 1958) и Б. Кошельски (Koscielski, 1966) планарии имеют один тип желточных клеток в коконе. Эти клетки полигональные, но вскоре часть из них трансформируется в веретеновидные под действием так называемого группирующего фактора. Другие авторы (Le Moigne, 1963; Cardona et al., 2006) находят два типа желточных клеток: округлые и веретеновидные. В отношении последовательности формирования эмбрионального эпителия и эмбриональной глотки также существует несогласованность данных. Одни авторы обнаруживают эпителий в виде слоя, на одном из полюсов которого позже формируется глотка (Fulinski, 1916; Seilern-Aspang, 1958; Koscielski, 1966). Другие считают, что эти процессы идут параллельно (Cardona et al., 2006).

Для прояснения этих особенностей раннего эмбрионального развития планарий мы предприняли попытку изучения этих процессов на примере *Dugesia lugubris* O. Schmidt, 1861.

### Материал и методы

Исследуемых планарий содержали в аквариумах объемом 1–4 л в отстоянной водопроводной и кипяченой воде в соотношении 2 : 1 при температуре 18–21°C. Кормили их трубочником (*Tubifex* sp.) или мотылем (*Chironomus* sp.) 2 раза в неделю. Для получения свежееотложенных коконов каждый час проводили осмотр стенок аквариумов и растений. Отложенные коконы инкубировали в чашках Петри отдельно от взрослых планарий во избежание каннибализма. Коконы извлекали для последующих исследований с интервалом в 1 ч в течении 1–6 ч после откладывания кокона, затем через 12 ч и от 1 до 4 сут с интервалом 24 ч.

При подготовке материала использовали традиционные для светооптических исследований методы: фиксацию жидкостью Буэна, дегидратацию этанолом и заливку в парафин. Серийные срезы коконов окрашивали железным гематоксилином Гейденгайна (Ромейс, 1953).

Изучение постоянных препаратов проведено на микроскопе МБИ—6. Размеры структур определяли с помощью окуляр-микрометра общепринятым способом. Съемку проводили с помощью микроскопа AxioImager M1 Zeiss.

## Результаты

Сразу после откладывания кокона. В коконе среди множества желточных клеток находились 2–5 оплодотворенных яйцевых клеток. Они были расположены равномерно по всему объему кокона. Средние размеры яйцевых клеток составляли 40 x 32 мкм. Они имели овоидную форму и очень светлую однородную цитоплазму (рис. 1). Желточные клетки отличались от яйцевых меньшими размерами (23,9 x 22,1 мкм), полигональной формой, большим хорошо окрашенным лопастным ядром с ядрышками. В их цитоплазме были видны многочисленные гранулы и мелкие вакуоли.

Через 1 час. Яйцевые клетки не изменились по сравнению с предыдущим периодом. Большинство желточных клеток приобрели округлую форму, но также были заметны и многогранные. Среди желточных клеток большинство клеток было с компактным базофильным содержимым и капельками желточных гранул разного размера. Находили клетки с дисперсным содержимым и разрушающиеся. Размеры клеток по сравнению с предыдущим этапом не изменились.

Через 5–7 часов. Вокруг каждой яйцевой клетки выстроились очень плотно друг к другу близлежащие желточные, которые сформировали слой толщиной в 1–2 клетки (рис. 2). Клетки этого слоя приобрели вытянутую веретеновидную форму, что их отличало от остальных желточных клеток в коконе.

Через 6–7 часов. Делится каждая яйцевая клетка, которая заключена в плотный слой желточных клеток (рис. 3). Образуется цепочка из 4 бластомеров, но они еще не имеют контакта друг с другом (рис. 4). Меняются и ассоциированные желточные клетки: их размеры несколько уменьшились, ядро за счет утраты базофильности стало светлым с очень большим плотным ядрышком. Увеличились размеры вакуолей, благодаря чему на препаратах ассоциированные желточные клетки выглядели светлее, чем неассоциированные.

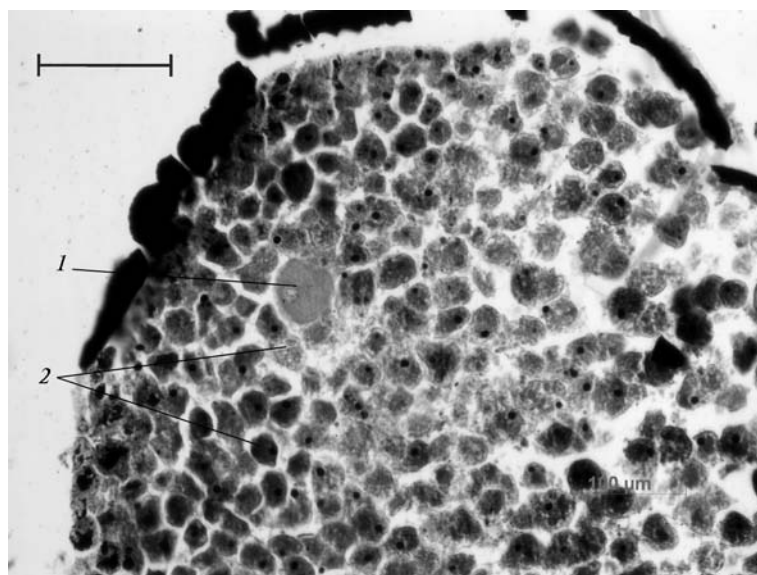


Рис. 1. Срез через кокон сразу после откладывания: 1 — яйцевая клетка; 2 — желточные клетки. Масштабная линейка 100 мкм.

Fig. 1. Section through the cocoon just after laying: 1 — egg cell; 2 — yolk cells. Scale bar 100 μm.

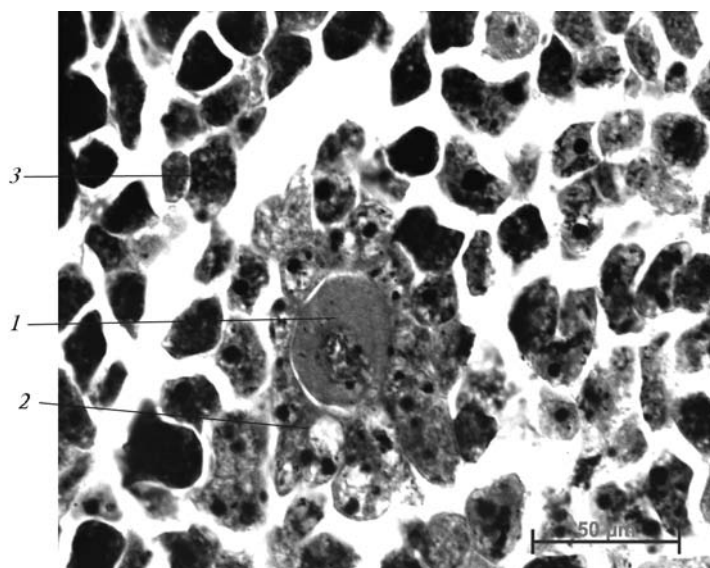


Рис. 2. Срез кокона через 5–7 ч после откладки: 1 — яйцевая клетка; 2 — ассоциированные желточные клетки; 3 — свободные желточные клетки. Масштабная линейка 50 мкм.

Fig. 2. Section through the cocoon in 5–7 hours after laying: 1 — egg cell; 2 — associated yolk cells. 3 — free yolk cells. Scale bar 50  $\mu$ m.

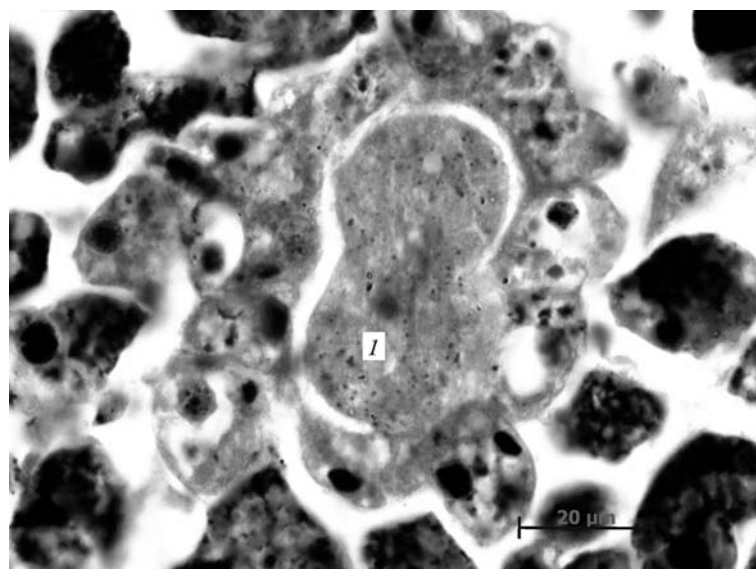


Рис. 3. Первое деление яйцевой клетки (1) через 6–7 ч после откладки. Масштабная линейка 20 мкм.

Fig. 3. First division of the egg cell (1) in 6–7 hours after laying. Scale bar 20  $\mu$ m.

Через 1-е сутки на 2-е. Образовавшиеся в результате дробления бластомеры по сравнению с 6–7 ч после откладки кокона из цепочки преобразовались в плотную группу (рис. 5). Ассоциированные желточные клетки слились, образовав синцитий. Этот синцитиальный желточный слой с этого момента мы называем «первичным» синцитием (термин наш, обсуждение ниже). Дальнейшее дробление происходило в первичном синцитии.

По окончании 2 суток. Плотная группа бластомеров приобретает сферическую конфигурацию. Они лежат довольно плотно в желточном синцитии. Мы

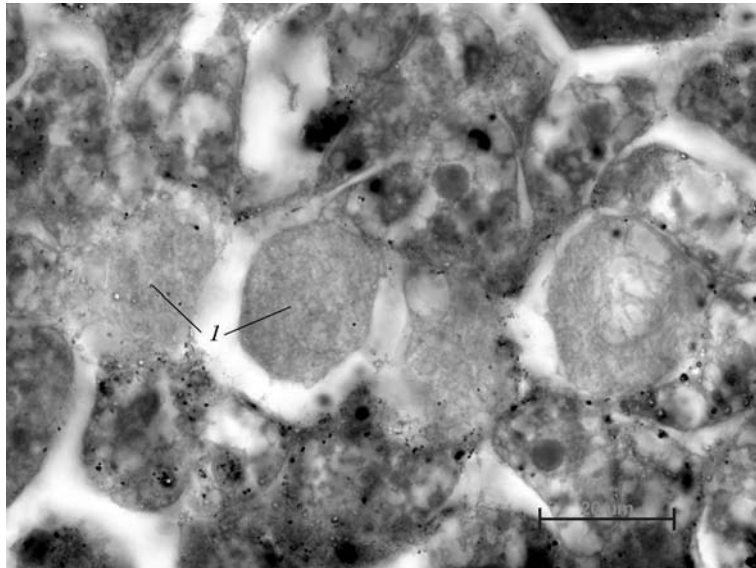


Рис. 4. Цепочка бластомеров (1). Масштабная линейка 20 мкм.

Fig. 4. Chain of blastomeres (1). Scale bar 20  $\mu\text{m}$ .

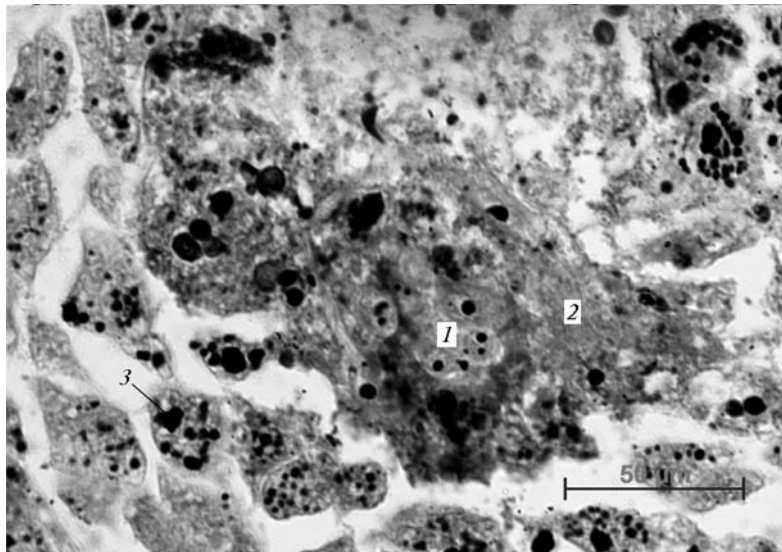


Рис. 5. Группа бластомеров (1) через 1 сут на 2-е: 2 — желточный синцитий; 3 — свободные желточные клетки. Масштабная линейка 50 мкм.

Fig. 5. Group of blastomeres (1) in 1 day on the 2-nd after laying: 2 — yolk syncytium; 3 — free yolk cells. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

находили 2–5 таких групп, расположенных равномерно по всему кокону. Вид бластомеров изменился. Их цитоплазма светлая, однородная светлое ядро и несколько больших очень плотных базофильных ядрышка. В то же время желточные клетки, которые не приняли участия в формировании желточного синцития, приобрели вид тяжей, между которыми были промежутки. Цитоплазма этих клеток плотная, с многочисленными желточными капельками, ядра округлые резко базофильные.

Через 3 суток. Наблюдаются несколько эмбрионов. Они лежат обособленно от желточных клеток, т. е. между эмбрионом и желточными клетками образовалось

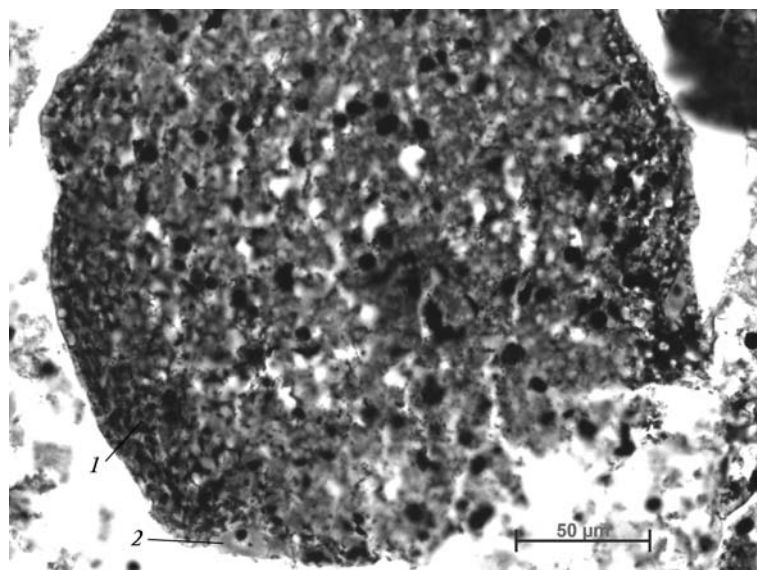


Рис. 6. Эмбрион (1) в коконе через 3 сут после откладки; 2 — клетки эмбрионального эпителия. Масштабная линейка 50 мкм.

Fig. 6. Embryo (1) in the cocoon in 3 days after laying; 2 — embryonic epithelium cells. Scale bar 50  $\mu$ m.

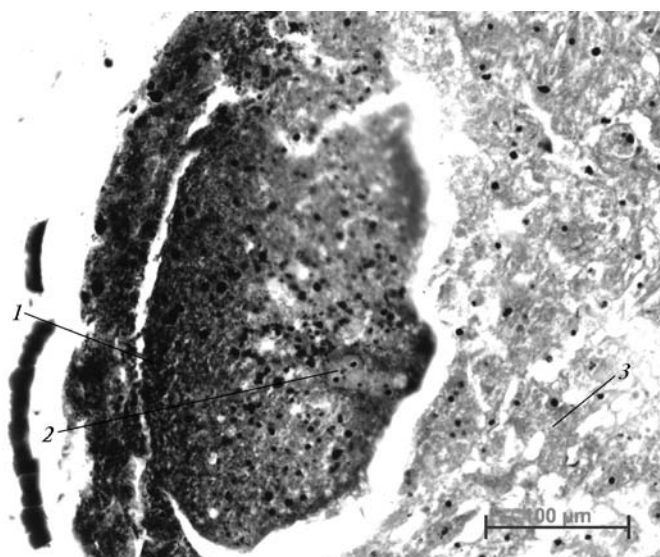


Рис. 7. Эмбрион (1) с бластомерами (2), формирующими эмбриональную глотку; 3 — тяжи желточных клеток. Масштабная линейка 100 мкм.

Fig. 7. Embryo (1) with blastomeres (2) forming embryonic pharynx; 3 — yolk cell bands. Scale bar 100  $\mu$ m.

свободное пространство. Желточный синцитий был базофильнее внешних желточных клеток, плотный, с многочисленными капельками и базофильными ядрами (рис. 6). Желточные клетки не изменились по сравнению со 2-мя сут. Через 3 сут после откладки кокона мы находили несколько уплощенных бластомеров на периферии эмбриона, которые формируют эмбриональный эпителий, а также несколько встраивающихся в него бластомеров. Эти клетки имели светлое ядро с 1–2 большими ядрышками и длинные цитоплазматические отростки, которыми они местами были соединены друг с другом. Кроме этого, нами были обнаружены бластомеры, стоящие недалеко от строящегося эпителия. Возможно, они переме-

щались в желточном синцитии для дальнейшего формирования провизорного (эмбрионального) эпителия, трансформируясь при этом из округлых в плоские. Мы также идентифицировали первые элементы строящейся эмбриональной глотки на одном из полюсов эмбриона (рис. 7).

### Обсуждение

Таким образом, по нашим данным, в коконе *D. lugubris* присутствуют 2–5 яйцевых клеток и большое количество желточных.

При изучении эмбрионального развития *Polycelis nigra* Müller, 1774 А. Лемонь (Le Moigne, 1963) находил два типа желточных клеток: одни более многочисленные, имеют цитоплазму богатую включениями; вторые мельче, веретеновидные, желточные включения более мелкие, цитоплазма богаче РНК, они формируют желточный синцитий и разделяют бластомеры. То же наблюдал и А. Кардона с коллегами (Cardona et al., 2006) при изучении эмбрионального развития *Schmidtea polychroa* O. Schmidt, 1862. Однако ряд других авторов выделяет только один тип желточных клеток (Mattiesen, 1904; Stevens, 1904; Seilern-Aspang, 1958; Koscielski, 1966; Sakurai, 1991). Но авторы устанавливали изменение формы желточных клеток, стоящие вокруг каждой яйцевой, в ходе эмбриогенеза. По мнению Ф. Зайлерн-Аспанг (Seilern-Aspang, 1958), яйцевые клетки выделяют некий фактор. Методом центрифугирования автор выделил из кокона планарий субстанцию, которую назвал группирующим фактором. Химическая природа этого фактора до сих пор не выяснена.

Мы наблюдали только один тип желточных клеток и в коконах в теле планарий, и в уже отложенных коконах (рис. 1). Уже через 5–7 ч после откладывания кокона мы наблюдали преобразование части желточных клеток из многоугольных в веретеновидные. Это всегда были желточные клетки, стоящие вокруг каждой яйцевой. Мы полагаем, что, как и в исследованиях Ф. Зайлерн-Аспанга (Seilern-Aspang, 1958), это было вызвано именно действием группирующего фактора. Размеры желточных клеток несколько уменьшаются за счет расхода питательного субстрата, а размеры вакуолей увеличиваются за счет их слияния (рис. 2). Б. Кошельски (Koscielski, 1966) показал, что в это время мелкие гранулы РНК, гликогена и митохондрии концентрируются на проксимальных полюсах веретеновидных желточных клеток.

Первая стадия дробления описывается часто (Fulinski, 1916; Seilern-Aspang, 1958; Le Moigne, 1963; Sakurai, 1991 и др.). Установлено, что при увеличении количества бластомеров они разделяются в конце телофазы (Le Moigne, 1963), не формируют компактной структуры наподобие бластулы, а лежат в виде цепочки не связанных между собой клеток. Такое дробление называется анархическим (Иванова-Казас, 1975; Tomas, 1986). В коконе *D. lugubris* мы находили цепочку бластомеров через 6–7 ч после откладки кокона (рис. 4).

В период до 2 сут мы обнаружили вокруг группы бластомеров слившиеся желточные клетки первого слоя. По мнению Ф. Зайлерн-Аспанга (Seilern-Aspang, 1958), это слияние вызвано выделением бластомерами так называемого синцитиального фактора. Т. Сакураи (Sakurai, 1991), проведя электронно-микроскопическое изучение формирования синцития у пресноводной планарии *Bdellocephala brunnea* Ijima et Kaburaki, 1916, пришел к выводу, что яйцеклетки, а потом и бластомеры выделяли вакуоли в межклеточное пространство, по крайней мере, 4 раза в течение исследуемого периода. Такое количество, по мнению автора, необходимо для получения достаточного объема фактора слияния. Но, как и в отношении так называемого группирующего фактора, так же пока не известна химическая природа синцитиального фактора.

Мы согласны с мнением этих исследователей, что желточные клетки сливаются под действием синцитиального фактора. При этом ассоциированные желточные клетки первого слоя, по нашему мнению, образуют «первичный синцитий». Клетки этого слоя трансформируются только под действием этого фактора, тогда как дальнейшее слияние вызвано не только выделенным blastomeres фактором, но и неким фактором самих желточных клеток первого слоя, освобожденным после их слияния.

Ф. Зайлерн-Аспанг (Seilern-Aspang, 1958) синцитиальную область с заключенными в ней blastomeres назвал моноцентрическим эмбриональным полем. На 2-е сут после откладывания кокона мы находили от 2 до 5 таких областей, которые располагались равномерно по всему кокону (рис 5).

От каждой из групп отделяется часть blastomeres и мигрирует к периферии желточного синцития (до 3 сут). На одном из его полюсов они уплощаются, формируя эмбриональный эпителий. А. Лемонь (Le Moigne, 1963) наблюдал, что на стадии 15 blastomeres у эмбриона *Polycelis nigra* 5–6 из них распластываются по периферии и формируют первый эскиз эмбрионального эпидермиса, а к концу стадии из 70 клеток его образование завершается. Е. Маттисен (Mattiesen, 1904) и Б. Кошельски (Koscielski, 1966) описывали эту структуру на стадии 24–30 клеток. Интересно, что Т. Сакураи и С. Ишии (Sakurai, Ishii, 1995) при изучении формирования первичного эпидермиса у эмбрионов пресноводных планарий наблюдали его зачаток в виде синцитиального слоя на периферии желточного синцития. Этот зачаток контактирует с поверхностью желточного синцития в месте, от которого он будет постепенно распространяться. Зачаток распространяется на противоположный полюс через пространства между синцитиальной и несинцитиальной желточными массами. Подобное движение, но клеток, напоминающее эпиболию, описывали и для других неофорных групп (Thomas, 1986). Б. Фулински (Fulinski, 1916) же считает, что эмбриональный эпителий — это наружная эмбриональная оболочка, под которой расположены эмбриональные клетки. По мнению А. Кардона и его коллег (Cardona et al., 2006), плоские клетки эпителия покрыты ресничками.

По нашим данным, эмбриональный эпителий, представленный плоскими вытянутыми клетками, не имеет ресничек. На 3 сут после откладывания кокона они еще не образуют сплошной слой (рис. 6), что согласуется с данными других авторов (Le Moigne, 1963; Cardona et al., 2006). В то же время эмбриональная глотка уже почти сформирована (рис. 7).

В отношении мнений о последовательности закладки провизорных эпителия и глотки остается ряд противоречий. Одни авторы обнаруживают эпителий в виде слоя, на одном из полюсов которого позже формируется глотка (Fulinski, 1916; Seilern-Aspang, 1958; Koscielski, 1966). Другие считают, что эти процессы идут параллельно (Cardona et al., 2006). Наши данные подтверждают вторую точку зрения. Мы объясняем это кинобластическим происхождением эмбриональных эпителия и глотки.

Таким образом, вместе с 2–5 яйцевыми клетками в коконе *D. lugubris* находится большое количество полигональных желточных клеток. Веретеновидные желточные клетки образуются из полигональных через 5–7 ч под действием группирующего фактора, выделенного яйцевыми клетками. В течении 3 сут происходит параллельное формирование эмбриональной глотки и эмбрионального эпителия, так что клетки будущего эпителия встраиваются беспорядочно по всему периметру желточного синцития.

- Иванова-Казас О. М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных: Простейшие и низшие многоклеточные. — Новосибирск : Наука, 1975. — 372 с.
- Ромеїс Б.* Микроскопическая техника. — М. : Изд-во иностр. лит., 1953. — 720 с.
- Bardeen Ch.* Embryonic and regenerative development in Planarians // Biol. Bull. — 1902. — **3**. — P. 262–288.
- Cardona A., Hartenstein V., Romero R.* Early embryogenesis of planaria: a cryptic larva feeding on maternal resources // Dev. Genes Evol. — 2006. — **216**. — P. 667–681.
- Fulinski B.* Die Keimblätterbildung bei Dendrocoelum lacteum // Oerst. Zool. Anz. — 1916. — **47**. — S. 380–400.
- Iijima J.* Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Süßwasser Dendrocoelen // Zeitsch. Wiss. Zool. — 1884. — **40**. — S. 359–464.
- Koscielski B.* Cytological and cytochemical investigations on the embryonic development of Dendrocoelum lacteum O. F. Müller // Zool Pol. — 1966. — **16**, N 1. — P. 83–102.
- Le Moigne A.* Etude de development embryonnaire de Polycelis nigra (Turbellarie, Triclade) // Bull Soc Zool Fr. — 1963. — **88**. — P. 403–422.
- Mattiesen E.* Ein Beitrag zur Embryologie der Süßwasserdendrocoelen // Zeitschr. f. Wiss. Zool. — 1904. — **77**. — S. 274–361.
- Methchnikoff E.* Die Embryologie von Planaria polychroa // Zeitsch. f. Wiss. Zool. — 1883. — **38**. — S. 331–354.
- Sakurai T.* An electron-microscopic study of syncytium formation during early embryonic development of the freshwater planarian Bdellocephala brunnea // Hydrobiologia. — 1991. — **227**, N. 1. — P. 113–118.
- Sakurai T., Ishii S.* An electron microscope study of primary epidermis formation in freshwater planarian embryos // Hydrobiologia. — 1995. — **305**, N 1–3. — P. 159.
- Seilern-Aspang F.* Entwicklungsgeschichtliche studien an paludicolen tricladen. // Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik. — 1958. — **150**. — S. 425–480.
- Stevens M.* On the germ cells and the embryology of Planaria simplissima // Proc. Natl. Acad. Sci Phila. — 1904. — **56**. — P. 208–220.
- Tekaya S., Sluys R., Zghal F.* Cocoon production, deposition, hatchling, and embryonic development in the marine planarian Sabussowia dioica (Platyhelminthes, Tricladida, Maricola) // Invert. Rep. Dev. — 1999. — **35**, N 3. — P. 215–223.
- Tomas M. B.* Embryology of the Turbellaria and its phylogenetic significance // Hydrobiologia. — 1986. — **132**. — P. 105–115.