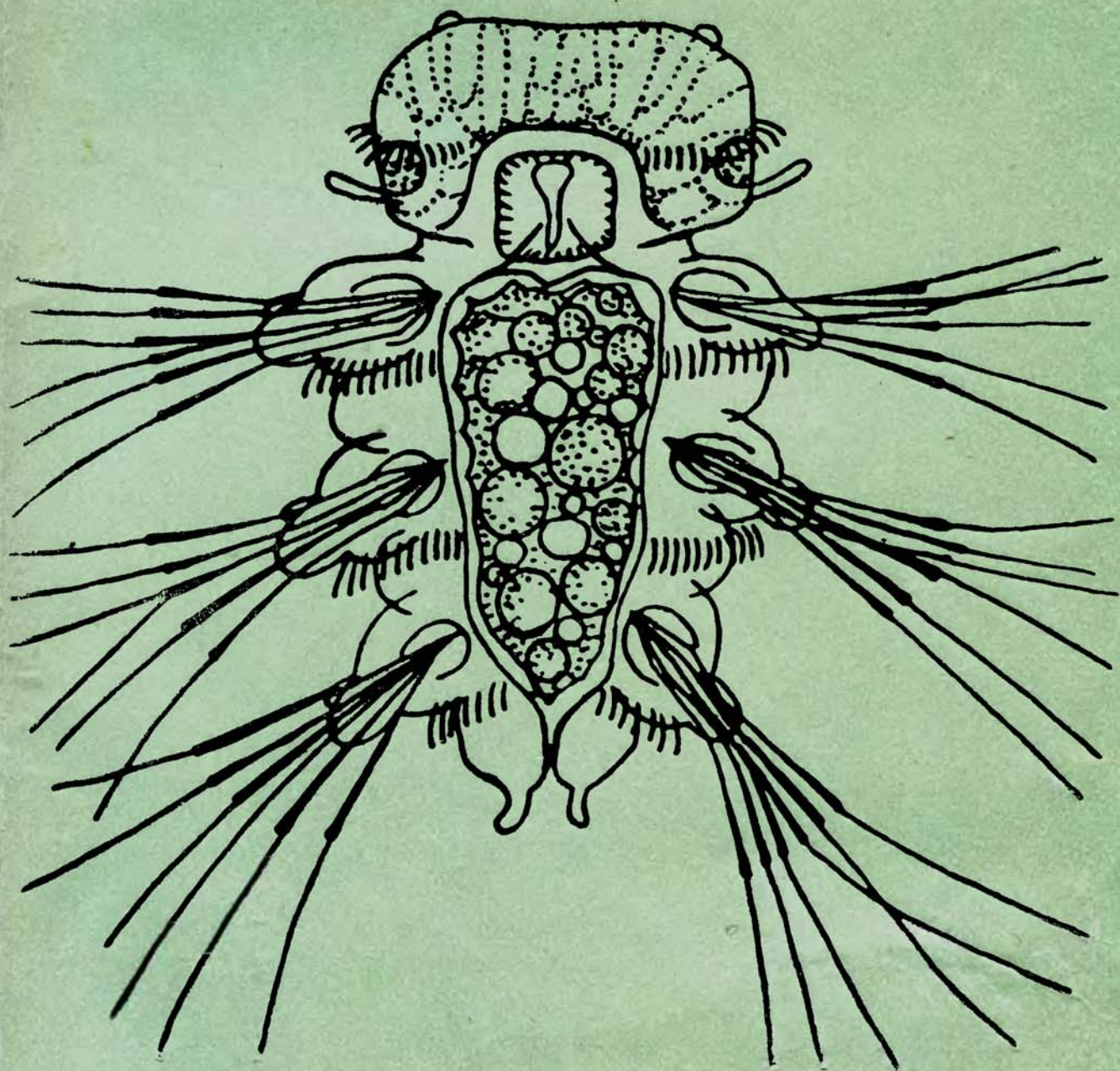


28.6.
П 691

Практикум по эмбриологии



ЛЕНИНГРАДСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА
И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени А. А. ЖДАНОВА

ПРАКТИКУМ ПО ЭМБРИОЛОГИИ

Учебное пособие

Под редакцией д-ра биол. наук
О. М. Ивановой-Казас



ЛЕНИНГРАД
ИЗДАТЕЛЬСТВО ЛЕНИНГРАДСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1986

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского Совета
Ленинградского университета*

УДК 591.3

Практикум по эмбриологии: Учеб. пособие / Под ред. Ивановой-Казас О. М. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1986. 232 с.

В связи с постановлением Министерства высшего и среднего специального образования СССР о введении на биолого-почвенных факультетах университетов курса биологии развития (общей эмбриологии) возникла проблема организации практических занятий по этому курсу. Предлагаемая книга подготовлена силами сотрудников кафедры эмбриологии ЛГУ. Она содержит программу практических занятий, проводимых на кафедре в течение многих лет. В нее включены разделы, посвященные половым клеткам и развитию основных групп животных (кишечнополостных, круглых и кольчатых червей, насекомых, иглокожих, ланцетника, рыб, амфибий, птиц и млекопитающих), а также даются инструкции к изготовлению необходимых препаратов. Поэтому книга может служить как большой практикум для студентов, специализирующихся в области эмбриологии.
Библиогр. 79 назв. Ил. 99.

Рецензенты: чл.-кор. АН СССР Ю. И. Полянский (Ин-т цитологии АН СССР) и д-р биол. наук В. М. Коровина (Зоол. ин-т АН СССР).

П $\frac{2007000009-039}{076(02)-86}$ 73—86

Издательство
Ленинградского
университета, 1986 г.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Необходимость создания практического руководства по эмбриологии возникла в связи с введением в 1975 г. в программы обучения на биолого-почвенных факультетах университетов курса биологии развития (общей эмбриологии). В основу предлагаемой книги положена программа практических занятий, проводимых на кафедре эмбриологии Ленинградского государственного университета в течение многих лет. В нее включены разделы, посвященные половым клеткам и оплодотворению и развитию основных групп животных (кишечнополостных, круглых и кольчатых червей, насекомых, иглокожих, моллюсков, рыб, амфибий, птиц и млекопитающих). Но так как обеспечение необходимыми учебными препаратами по всем этим группам животных централизованным путем пока не налажено, в книге даются инструкции к их изготовлению. Поэтому книга может служить руководством и для самостоятельной работы студентов, специализирующихся в области эмбриологии.

Мы не включили в книгу описания обычных методик фиксации материала, изготовления тотальных препаратов и срезов и т. д., так как эти сведения приводятся в специальных руководствах по микроскопической технике (например, у Роскина и Левинсона, 1975; можно рекомендовать также вводный раздел «Большом практикуме по зоологии беспозвоночных» А. В. Иванова, Ю. И. Полянского и А. А. Стрелкова, 1981), но сочли необходимым упомянуть более специальные приемы, применяемые при работе с каждым объектом.

Предполагается, что приступая к практической работе, учащиеся предварительно получают необходимые теоретические сведения по каждой теме из лекций и учебников эмбриологии [Иванов, 1937; Шмидт, 1951, 1952; Кнорре, 1959; Токин, 1977; Белоусов, 1980; Иванова-Казас, 1975—1981, и др.]. Поэтому в

книге не дается подробного и всестороннего описания развития каждой группы животных, а сообщаются лишь сведения, необходимые для понимания препаратов. Однако мы сочли полезным дать ссылки на литературные источники, которые могут пригодиться при самостоятельном более углубленном изучении развития того или иного конкретного вида животных.

Групповые практические занятия могут быть построены по одному из двух принципов: монографическому или сравнительному. В первом случае материал рассматривается в систематическом порядке (развитие кишечнораотовых, червей, насекомых и т. д.); во втором — по темам (гаметогенез и строение половых клеток, дробление, образование зародышевых листков, органогенез, постэмбриональное развитие). Первый из названных вариантов имеет то преимущество, что дает более цельное представление о развитии отдельных групп животных, но он требует большего количества учебных часов. Поскольку в нашем руководстве дается не только описание препаратов, но и рекомендации о получении нужных объектов и их последующей обработке, мы сочли более целесообразным расположить материал по монографическому принципу (как особая тема в сравнительном плане рассматриваются только гаметогенез и половые клетки).

Мы считаем необходимым подчеркнуть, что изучение препаратов обязательно должно сопровождаться их зарисовкой, так как при этом внимание студента фиксируется на таких деталях, которые при беглом рассмотрении препарата остаются незамеченными. Приобретение навыков такого технического рисунка доступно каждому и является существенной составной частью подготовки специалиста в области эмбриологии, так как фотография не может полностью заменить рисунок. Хотя рисование неизбежно связано с некоторой схематизацией, однако эта схематизация есть творческий процесс — она заставляет рисующего анализировать наблюдаемые картины, выделять существенное и типичное и отбрасывать второстепенное и случайное.

Книга написана в основном силами сотрудников кафедры эмбриологии ЛГУ, но в ее написании приняли участие также ассистент кафедры ихтиологии и гидробиологии ЛГУ Ю. К. Кузнецов и мл. н. сотр. отдела эмбриологии ИЭМ Л. А. Конописцева.

Мы считаем своим долгом выразить глубокую признательность заведующему кафедрой эмбриологии ЛГУ проф. Б. П. Токину, по инициативе и под наблюдением которого была выполнена наша работа, а также ст. н. сотр. ЗИН АН СССР В. М. Коровиной, ст. н. сотр. ИНЦ АН СССР М. Н. Грузовой и сотрудникам БиНИИ ЛГУ Н. А. Буцкой и В. И. Ефремову за консультации и ценные критические замечания.

ГАМЕТОГЕНЕЗ И СТРОЕНИЕ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ГАМЕТОГЕНЕЗЕ

Гаметогенез — это процесс размножения и дифференцировки половых клеток.* У низших *Metazoa* — губок, кишечнополостных и некоторых червей — гаметы периодически возникают из соматических клеток на протяжении всей жизни особи. У большинства более высокоорганизованных животных началу гаметогенеза предшествует возникновение полового зачатка — гонобласта. Клетки гонобласта — первично-половые клетки, образуются на ранних стадиях развития зародыша еще до образования гонад и часто вдали от места их закладки. Позже первично-половые клетки мигрируют в зачатки гонад и дают начало при развитии семенника первичным сперматогониям, при развитии яичника — первичным оогониям. Первичные сперматогонии и оогонии — это стволовые клетки для всех последующих поколений половых клеток организма.

Гаметогенез делят на периоды размножения, роста, созревания. Половые клетки разных периодов отличаются по морфологическим и физиологическим качествам. Важными генетическими событиями гаметогенеза являются: во-первых, редукция числа хромосом до гаплоидного, что обеспечивает постоянство числа хромосом в ряду поколений (диплоидность восстанавливается при оплодотворении); во-вторых — рекомбинация генетического материала между гомологичными хромосомами в ходе кроссинговера и — между клетками в ходе мейотических делений, что обеспечивает генетическую разнокачественность половых клеток и потомства.

* Общие представления о процессах гаметогенеза даются в учебниках эмбриологии: более подробные сведения можно найти в сводках: Х. Равен, Оогенез, 1964; Основы цитологии, т. III, гл. 13, 1966; Современные проблемы оогенеза, 1977; Т. Б. Айзенштадт. Цитология оогенеза. М., 1984; Л. В. Данилова. Ультраструктурное исследование сперматогенеза, 1977; Э. Рузен-Ранге. Сперматогенез у животных. 1980; Современные проблемы сперматогенеза, 1982.

В первом периоде сперматогенеза — периоде размножения — осуществляется ряд последовательных митотических делений, вступивших в гаметогенез клеток — оогониев или сперматогониев. Число гониальных делений относительно постоянно для каждого вида, но в сперматогенезе обычно большее, чем в оогенезе. Гонии разных генераций различаются по величине и по степени конденсации хроматина. По завершении размножения последнее поколение гониев вступает в предмейотическую интерфазу, во время которой осуществляется единственная на два мейотических деления репликация ДНК. Таким образом, клетки вступают в мейоз с тетраплоидным количеством ДНК.

Следующий этап гаметогенеза — период роста — характеризуется увеличением объема половых клеток. Мужские половые клетки в этот период называют сперматоцитами, а женские — ооцитами первого порядка. Период роста совпадает во времени с профазой мейоза, которую подразделяют на ряд стадий. В лептотене начинается спирализация хромосом, в зиготене гомологичные хромосомы конъюгируют и образуют биваленты; в пахитене по завершении конъюгации хромосом усиливается их спирализация, по-видимому, в этот же период происходит кроссинговер. На диплотенной стадии начинается расхождение гомологов в составе бивалентов, при этом видно, что каждая хромосома состоит из двух хроматид, а каждый бивалент — из четырех, т. е. составляет тетраду. Между несестринскими хроматидами в составе бивалентов обнаруживаются перекресты — результат кроссинговера. В период диакинеза спирализация достигает максимума, а гомологичные хромосомы еще более расходятся. Профаза мейоза подготавливает два мейотических деления гаметоцитов, что отражено в четырехнитчатой структуре бивалентов.

На протяжении третьего этапа гаметогенеза — периода созревания осуществляются два мейотических деления или деления созревания. При первом из них — редукционном — благодаря расхождению в анафазе гомологичных хромосом из состава каждого бивалента число хромосом в каждой из образующихся клеток становится гаплоидным. Второе деление мейоза — эквационное — характеризуется расхождением к полюсам веретена деления хроматид, т. е. оно происходит по типу митоза. Клетки, возникающие в сперматогенезе при первом делении созревания, называются сперматоцитами второго порядка, при втором — каждый сперматоцит второго порядка делится на две сперматиды. В оогенезе четыре клетки, формирующиеся в результате двух делений мейоза, неравноценны, лишь одна из них превращается в зрелое яйцо, три остальные мелкие, в дальнейшем они погибают; их называют редукционными или направительными тельцами или полоцитами. Следует подчеркнуть, что процесс мейоза охватывает два периода гаметогенеза: периоды роста и созревания.

При развитии половых клеток без гонад, непосредственно в тканях тела, гаметогенез называют диффузным; он встречается у губок, некоторых кишечнополостных, бескишечных турбеллярий, некоторых немертин. У большинства животных развитие половых клеток происходит в гонадах — семенниках или яичниках; в этом случае гаметогенез называют локализованным.

Если развитие и питание половых клеток осуществляется без участия специализированных вспомогательных элементов, то гаметогенез называют солитарным (от лат. *solus* — единственный), например у некоторых кишечнополостных или червей. Когда в развитии половых клеток участвуют специализированные клетки, например трофоциты насекомых, или ткани, например фолликулярные эпителии гонад позвоночных, гаметогенез называют алиментарным (от лат. *alimentum* — содержание, иждивение). Диффузный и локализованный гаметогенез может проходить как по солитарному, так и по алиментарному типу.

2. СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Процессы сперматогенеза и оогенеза имеют особенности, обусловленные различиями в строении и физиологии зрелых мужских и женских половых клеток. В сперматогенезе в период размножения осуществляется от трех до четырнадцати гониальных делений, число которых для каждого вида относительно постоянно и варьирует в незначительных пределах. На протяжении периода роста объем сперматоцитов I порядка у большинства животных возрастает незначительно. В ходе мейотических делений образуется четыре гаплоидных сперматиды. При гониальных и мейотических делениях сперматогенеза в большинстве случаев цитотомия не завершается; в результате чего клон клеток — потомков исходного сперматогония — представляет собой синцитий. Полное разделение клеток осуществляется лишь в конце сперматогенеза при отбрасывании сперматидами остаточной цитоплазмы.

Заключительный этап сперматогенеза — период формирования, в ходе которого сперматиды подвергаются значительным преобразованиям. Клетка удлиняется, хроматин в ядре конденсируется, объем ядра уменьшается, избыточная кариоплазма элиминируется и разрушается в цитоплазме. Клетка приобретает полярность, благодаря перемещению к одному ее полюсу сетчатого аппарата, который преобразуется в акросому — органойд, облегчающий проникновение спермия в яйцо. Акросома часто имеет форму пузыревидного колпачка, одевающего конец ядра спермия. В акросомном пузырьке содержатся гидролитические ферменты, при осеменении размягчающие яйцевые оболочки. К другому полюсу клетки перемещаются клеточный центр и митохондрии. Центриоли клеточного центра распола-

гаются под ядром сперматиды рядом или одна под другой, дистальная центриоль участвует в образовании хвостовой нити жгутика спермия. Митохондрии обычно сливаются в более крупные структуры — хондриосферы, которые окружают верхнюю часть хвостовой нити. Большая часть цитоплазмы сперматиды — остаточная или резидуальная — отбрасывается в ходе спермиогенеза, сохранившаяся цитоплазма тонким слоем одевает поверхность сперматозоида.

При солитарном сперматогенезе развитие спермиев осуществляется непосредственно в тканях тела (у некоторых кишечнополостных), либо в полости целома (у некоторых полихет).

Алиментарный сперматогенез обычно локализован, т. е. происходит в семенниках. У позвоночных структурными единицами семенников являются семенные фолликулы или семенные каналцы. Фолликулы и каналцы выстланы фолликулярным эпителием, между клетками которого и в сети их цитоплазматических отростков располагаются половые клетки. У низших позвоночных клетки фолликулярного эпителия образуют внутри фолликулов или каналцев мешковидные замкнутые цисты (сперматоцисты), внутри которых и развиваются половые клетки.

Фолликулярный эпителий семенников выполняет в отношении развивающихся половых клеток многообразные вспомогательные функции. Так, например, у млекопитающих он участвует в питании половых клеток, играет защитную роль, препятствуя проникновению ряда веществ в семенные каналцы; выполняет опорно-механическую функцию — половые клетки жестко закреплены отростками фолликулярных клеток в стенке семенного каналца; фолликулярные клетки также вырабатывают некоторые гормоны, регулирующие сперматогенез, фагоцитируют погибающие половые клетки и т. д.

ОПИСАНИЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ПО ПРЕПАРАТАМ

Семенник лягушки *Rana temporaria* (срез). Материал следует собрать в конце июня — начале июля,* когда в семенниках лягушек имеются половые клетки на всех стадиях сперматогенеза, кроме зрелых спермиев, и в один из зимних месяцев, когда в семенных каналцах обнаруживаются лишь первичные сперматогонии и зрелые сперматозоиды. Семенники имеют бобовидную форму, они расположены на вентральной стороне почек, поверхность семенников более или менее пигментирована. Техника вскрытия лягушек и извлечения семенников изложена на с. 159.

Для лучшего проникновения фиксатора семенник предвари-

* Все сроки, связанные с сезонными явлениями гамтогенеза, приведены для Ленинградской области.

тельно разрезают на две-три части, фиксируют в смеси Буэна не менее суток, затем проводят материал через спирты возрастающей концентрации, оставляя в каждом на 3—4 ч, в карбол-ксилоле и ксилоле содержат материал по 30—40 мин, в парафине — около часа. Срезы толщиной 5—7 мкм окрашивают квасцовым или железным гематоксилином с докраской эозином или светлым зеленым. Препарат изучают при большом увеличении микроскопа.

На препарате видны перерезанные в различных направлениях семенные каналцы, разделенные тонкими прослойками соединительной ткани, отходящими от белковой оболочки семенника. Рассмотрев срез при малом увеличении, выбирают один из каналцев для более подробного изучения при большом увеличении.

Стенка семенного каналца состоит из соединительно-тканной теки и фолликулярного эпителия, разделенных базальной мембраной (рис. 1, а). В каналце вдоль базальной мембраны, между клетками фолликулярного эпителия располагаются крупные первичные сперматогонии, представляющие собой стволовые клетки сперматогенеза. Их потомки — все последующие поколения гониев — называются вторичными сперматогониями. Ядро первичных сперматогониев лопастной или сферической формы содержит рыхлую хроматиновую сеть и одно или два ядрышка. К поверхности сперматогониев прилегают уплощенные фолликулярные клетки с бобовидным ядром. Местами у базальной мембраны расположены неконтактирующие со сперматогониями (свободные) фолликулярные клетки.

Большая часть среза через каналец занята мешковидными цистами, примыкающими к базальной мембране каналца и свисающими в его просвет. Так как одна циста ложится на несколько срезов, ее контакт с базальной мембраной не всегда виден. Стенка цисты образована несколькими фолликулярными клетками, ядра которых можно видеть в ее составе. Внутри цист между отростками фолликулярных клеток располагаются половые клетки. В каждой цисте развитие половых клеток происходит синхронно, так как они представляют собой единый клон клеток. В разных и даже в соседствующих цистах одного среза можно наблюдать половые клетки на разных этапах сперматогенеза.

Сперматогонии в цистах лежат плотно, видны картины митотических делений этих клеток. Гонии разных генераций различаются по величине и к концу периода размножения заметно мельчают.

Цисты с половыми клетками периода роста легко найти, так как сперматоциты I порядка — наиболее крупные из клеток, расположенных внутри цист. В ядрах сперматоцитов I порядка на разных стадиях профазы мейоза — лептотены, зиготены и диплотены — видны интенсивно окрашенные хромосомы. Для

идентификации этих стадий лучше пользоваться иммерсионным объективом. Детали мейоза изучаются в курсах цитологии и генетики.

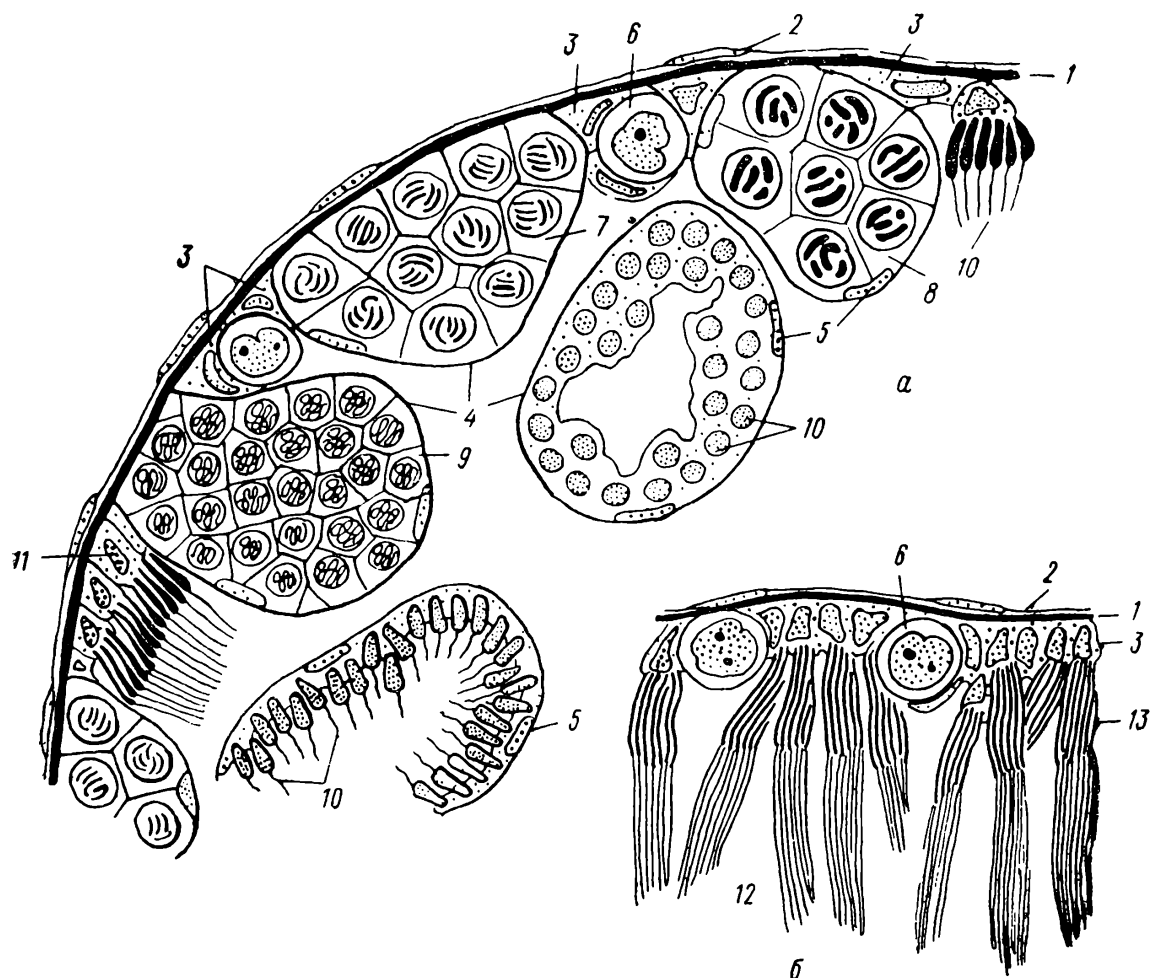


Рис. 1. Участки семенного канальца травяной лягушки в летние (а) и осенне-зимние (б) месяцы. Ув. 7×90 .

1 — базальная мембрана фолликулярного эпителия, 2, 3 — клетки соединительнотканной (2) семенного канальца и фолликулярного эпителия (3), 4 — сперматоциты, 5 — ядра фолликулярных клеток, образующих стенки сперматоцитов, 6 — первичные сперматогонии, 7 — сперматоциты I порядка, 8 — сперматоциты I порядка в период первого деления созревания, 9 — сперматоциты II порядка, 10 — сперматиды, 11 — фолликулярные клетки с имплантированными в их апикальную цитоплазму пучками сперматид, 12 — полость семенного канальца, 13 — сперматозоиды.

Среди цист, содержащих половые клетки периода созревания, можно найти: цисты со сперматоцитами I порядка на разных этапах I мейотического деления (чаще всего это картины метафазы I деления созревания); сперматоциты II порядка, которые заметно меньше сперматоцитов I порядка, их ядра могут иметь интеркинетическое строение или находиться на одном из этапов второго деления созревания. Наибольший объем имеют цисты со сперматидами. Ранние сперматиды рыхло располагаются в полости цист. Только что образовавшиеся сперматиды значительно меньше, чем сперматоциты, их ядра имеют крупно-глыбчатый хроматин. На более поздних этапах спермо-

генеза можно видеть, что сперматиды становятся овальными, у них появляется хвостовая нить; хроматин ядра более конденсирован. На заключительном этапе спермиогенеза головка приобретает палочковидную форму, характерную для зрелого спермия лягушки, хвостовая нить удлиняется. Стенка сперматоцист в этот период утолщена, так как отростки фолликулярных клеток, ранее пронизывавшие полость цисты, втягиваются. Сперматиды, первоначально свободно лежавшие в полости сперматоцисты, располагаются теперь по ее периферии, они внедряются головками в цитоплазму фолликулярных клеток, образующих стенку цисты.

В дальнейшем происходит подтягивание фолликулярных клеток, составляющих стенки сперматоцист, вместе с внедренными в их цитоплазму сперматидами к базальной мембране канальца.

Таким образом, на препарате в одном или нескольких канальцах можно видеть разные моменты сперматогенеза.

К сентябрю половые клетки всех сперматоцист проходят через описанные этапы сперматогенеза. Клеточный состав канальцев семенников, зафиксированных в осенние или зимние месяцы более однообразен (рис. 1, б); в них можно видеть лишь крупные первичные сперматогонии, с прилегающими к их поверхности фолликулярными клетками, и пучки зрелых спермиев, внедренных в апикальную цитоплазму фолликулярных клеток. Основания таких фолликулярных клеток закреплены на базальной мембране канальца. С наступлением весны под влиянием гормонального сигнала спермии освобождаются от связи с фолликулярными клетками и выходят в просвет канальцев. После этого новая генерация гониев вступает в сперматогенный цикл.

Семенник крысы (срез). Для умерщвления крысу помещают под стеклянный колпак, положив туда вату, смоченную эфиром. Вскрыв мошонку, отпрепаровывают семенник (рис. 2) от одевающей его серозной оболочки. Фиксируют в смеси Буэна (24 ч); для лучшего проникновения фиксатора рекомендуется раз-

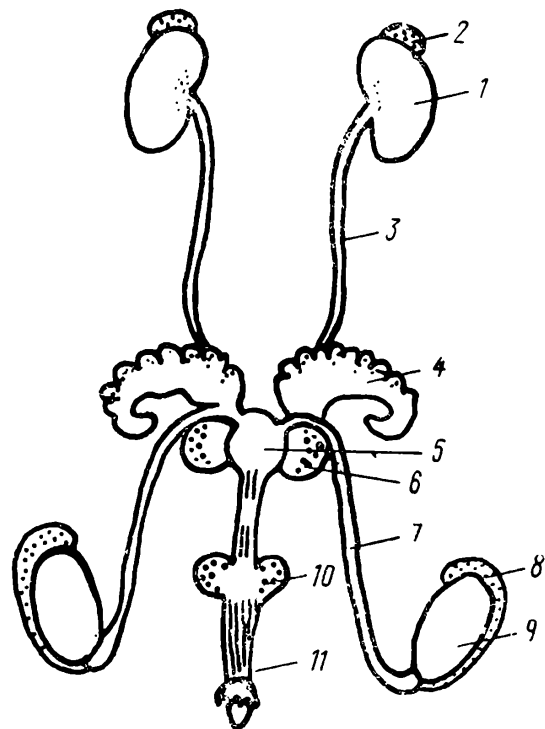


Рис. 2. Строение мужской половой системы крысы [Адольф и др.].

1 — почка, 2 — надпочечник, 3 — мочеточник, 4 — семенной пузырек, 5 — мочевой пузырь, 6 — предстательная железа, 7 — семяпровод, 8 — придаток семенника, 9 — семенник, 10 — Куперова железа, 11 — половой член.

резать семенник на несколько частей. Проводят материал через спирты возрастающей концентрации, оставляя в 70%-ном спирте на сутки, в остальных — на 2-3 ч, сменяя каждый из спиртов несколько раз, чтобы избавиться от избытка пикриновой кислоты. Затем проводят материал через карбол-ксилол и ксилол (по 30-50 мин), ксилол-парафин (6 ч) и заключают в парафин. Изготавливают срезы толщиной 7 мкм и окрашивают их квасцовым или железным гематоксилином с докраской эозином. Препарат изучают при большом увеличении микроскопа.

На срезе семенника крысы видны участки перерезанных

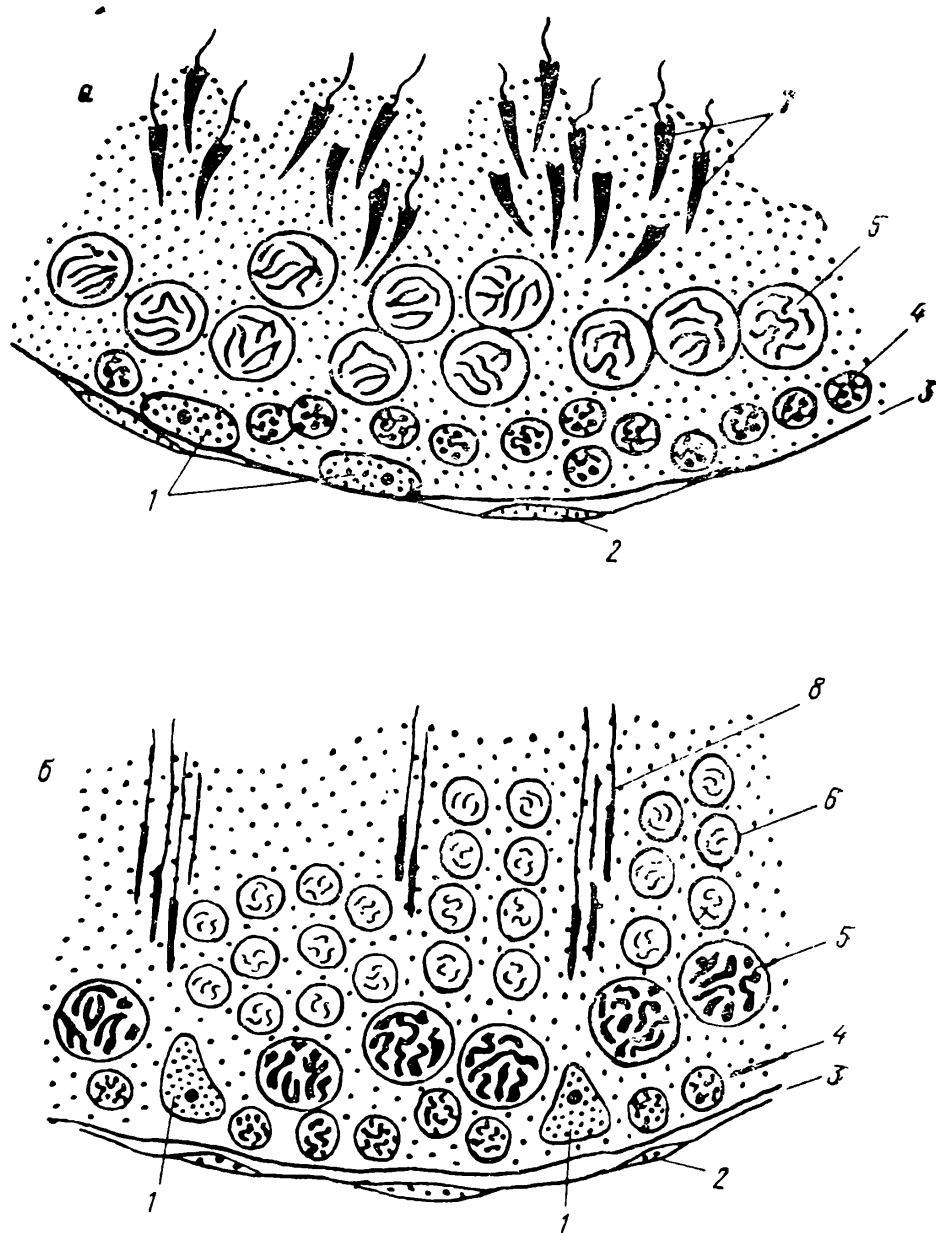


Рис. 3. Участки семенного канальца крысы в разные моменты (а, б) сперматогенного цикла. Ув. 7×90 .

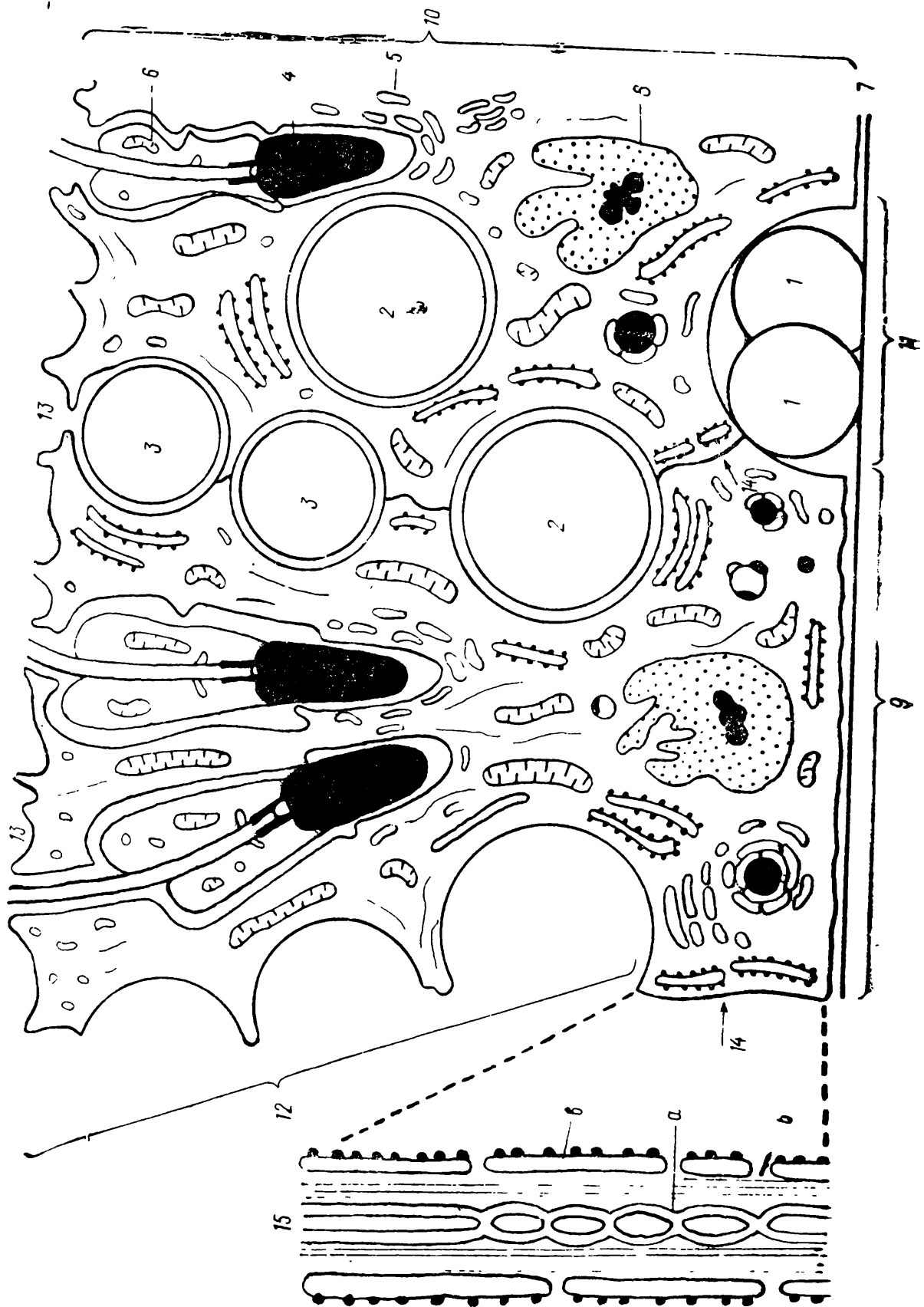
1 — ядра клеток фолликулярного эпителия (клеток Сертоли), 2 — ядра уплощенных клеток соединительнотканной теки семенного канальца, 3 — базальная мембрана фолликулярного эпителия, 4 — сперматогонии, 5 — сперматоциты I порядка, 6 — ранние сперматиды, 7 — сперматиды, 8 — сперматозонды.

семенных канальцев, между которыми находится интерстициальная ткань. Стенка семенного канальца в своей наружной части образована соединительной тканью. Изнутри канальцы выстланы фолликулярным эпителием, между клетками которого и в сети их цитоплазматических отростков располагаются половые клетки. Сперматогонии лежат у базальной мембраны канальца; по мере развития половые клетки более поздних стадий сперматогенеза смещаются к его просвету (рис. 3).

Тело каждой из фолликулярных клеток, которые у млекопитающих называются клетками Сертоли, тянется от базальной мембраны до просвета семенного канальца. При светооптических наблюдениях различима главным образом базальная, более массивная часть клеток Сертоли, содержащая крупное ядро пирамидальной или овальной формы с крупным ядрышком; кариоплазма слабо базофильна; ядра клеток Сертоли окрашиваются значительно слабее, чем ядра половых клеток. Тонкие тяжи цитоплазмы фолликулярных клеток, плохо выявляемые при обычных методах окраски, заполняют все промежутки между половыми клетками. Долгое время считалось, что клетки Сертоли образуют синцитий, так как их межклеточные границы не выявляются при светооптических наблюдениях, однако электронно-микроскопические исследования доказали индивидуальность каждой фолликулярной клетки (рис. 4).

Между основаниями фолликулярных клеток, у базальной мембраны канальца расположены группы сперматогониев, здесь можно встретить картины гониальных митозов; эта периферическая область семенного канальца носит название зоны размножения (рис. 3). Над группами сперматогониев цитоплазма фолликулярных клеток смыкается в виде арок (рис. 4), что в световой микроскоп не всегда можно увидеть. Контакты между клетками Сертоли в этих участках имеют характер плотных межклеточных соединений, которые непроницаемы для большинства веществ, поступающих в семенные канальцы из крови (рис. 4). Благодаря этому в семенниках млекопитающих существует защитный гематотестикулярный барьер. Таким образом, все пространство семенного канальца разделено на два отсека (компартамента) — базальный, в котором располагаются сперматогонии, и околополостной отсек, где сосредоточены половые клетки более поздних стадий: сперматоциты, сперматиды и спермии. Питательные и иные вещества к половым клеткам околополостного отсека проходят избирательно, в основном через цитоплазму фолликулярных клеток.

Область локализации сперматоцитов I порядка называется зоной роста, она располагается ближе к центру канальца, вслед за зоной размножения (см. рис. 3). Сперматоциты I порядка — это крупные клетки, в ядрах которых четко выявляются интенсивно окрашенные хромосомы. Структура ядер сперматоцитов I порядка может быть различной в зависимости от стадии про-



фазы мейоза, на которой они находятся (сравн. рис. 3, *a* и 3, *б*).

Еще ближе к просвету канальца в зоне созревания видны более мелкие клетки со светлым ядром — это ранние сперматиды (рис. 3), здесь же (на некоторых препаратах) можно наблюдать картины первого и второго деления созревания.

Ближе всего к центру семенного канальца лежит зона формирования, в которой осуществляется спермиогенез, располагаются сперматиды разного возраста и сперматозоиды. Головки поздних сперматид и сперматозоидов внедрены в апикальную цитоплазму фолликулярных клеток (рис. 4). Следует обратить внимание на то, что в разных участках семенного канальца можно видеть различные сочетания половых клеток, находящихся на разных этапах сперматогенеза. Это связано с асинхронностью и волнообразным распространением сперматогенеза по длине семенного канальца. Соответственно созревание половых клеток происходит не одновременно в разных участках семенного канальца. Это обеспечивает непрерывное созревание половых продуктов на протяжении сезона размножения или круглогодично, как у ряда лабораторных животных, например у белой крысы.

СТРОЕНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Для спермиев большинства животных характерна флагеллоидная форма (типичные сперматозоиды). В составе типичного сперматозоида различают головку, промежуточный отдел и жгутик (рис. 5, *a*). Большую часть головки составляет ядро. Оно чаще всего имеет удлиненную форму. Хроматин ядра находится в конденсированном состоянии, обусловленном плотным упорядоченным расположением нитей ДНП, большая часть кариоплазмы элиминируется в ходе спермиогенеза. В передней части головки спермия перед ядром находится акросомный аппарат. В простейшем случае он состоит из акросомного пузырька, содержащего гидролитические ферменты, смягчающие яйцевые оболочки при осеменении. У многих животных позади акросомного пузырька (рис. 6, *a*), вдаваясь в ядро, располагается либо субакросомный материал (он участвует в формиро-

Рис. 4. Схема взаиморасположения фолликулярного эпителия и половых клеток в стенке семенного канальца у млекопитающих по данным электронной микроскопии (по: Фосетт).

1 — сперматогонии, 2 — сперматоциты I порядка, 3, 4 — ранние (3) и поздние (4) сперматиды, 5 — область специализированного контакта фолликулярной клетки со сперматидой, 6 — резидуальная цитоплазма сперматиды, 7 — базальная мембрана фолликулярного эпителия, 8, 9 — ядро (8) и основание (9) фолликулярной клетки, 10 — область расположения фолликулярной клетки (от базальной мембраны до просвета канальца), 11, 12 — участки базального (11) и околополостного (12) отсеков, 13 — полость канальца, 14 — область специализированного контакта между клетками фолликулярного эпителия, 15 — плотный межклеточный контакт в фолликулярном эпителии (*a* — мембрана клетки в области контакта, *б* — микрофиламенты, *в* — цистерны эндоплазматического ретикулаума).

вании акросомной нити при осуществлении акросомной реакции), либо субакросомный тяж, состоящий из многочисленных тонких фибрилл (перфораторий), облегчающих прободение оболочек яйца при оплодотворении. Перечисленные компоненты

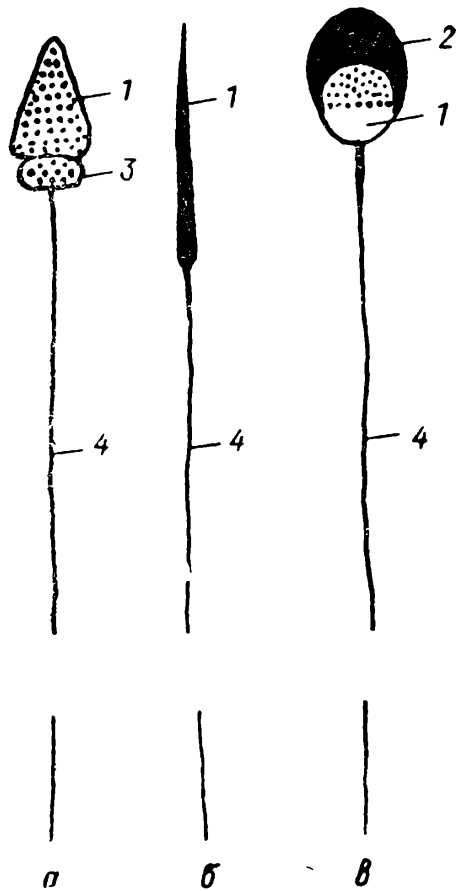


Рис. 5. Сперматозоиды морского ежа (а) [Дроздов], лягушки (б) и морской свинки (в). Ув. 7×90 .

1 — ядро, 2 — акросома, 3 — промежуточный отдел, 4 — жгутик.

акросомного аппарата — акросомный пузырек, субакросомный материал, перфораторий — не обязательно присутствуют в сперматозоиде в полном наборе. У некоторых животных — насекомых, костистых рыб, имеющих в яйцевых оболочках микропиле, акросомный аппарат вообще отсутствует.

В промежуточном отделе сперматозоида располагаются клеточный центр и митохондрии (рис. 6, б). Две центриоли клеточного центра лежат в верхней части промежуточного отдела одна над другой, дистальная дает начало хвостовой нити спермия. Микротрубочки в числе, обычном для центриолей большинства животных (две центральные и девять периферических), продолжают от дистальной центриоли в жгутик спермия, образуя фибриллы его осевого комплекса (рис. 6, в), у основания жгутика сперматозоида вокруг его осевого комплекса располагаются митохондрии. Часто митохондрии сперматозоидов в

результате слияния образуют более крупные образования — хондриосферы (рис. 6, б). Функция митохондрий состоит в выработке энергии, необходимой для движения жгутика.

В составе жгутика различают его основной и концевой отделы, последний отличается меньшим диаметром, чем основной отдел. Разница диаметров основного и концевых отделов жгутика объясняется окончанием некоторых фибрилл осевого комплекса на границе этих отделов. На поверхности жгутика находится тонкий слой цитоплазмы. Все отделы сперматозоида покрыты единой плазматической мембраной.

Следует иметь в виду, что при увеличениях светового микроскопа не удастся рассмотреть детали строения акросомы, промежуточного отдела и жгутика, которые были изучены с помощью специальных цитологических методик и электронного

микроскопа. Строение типичных сперматозоидов у различных групп животных варьирует в деталях (форма головки, строение и расположение акросомы и митохондрий, состав осевого комплекса) и по степени сложности.

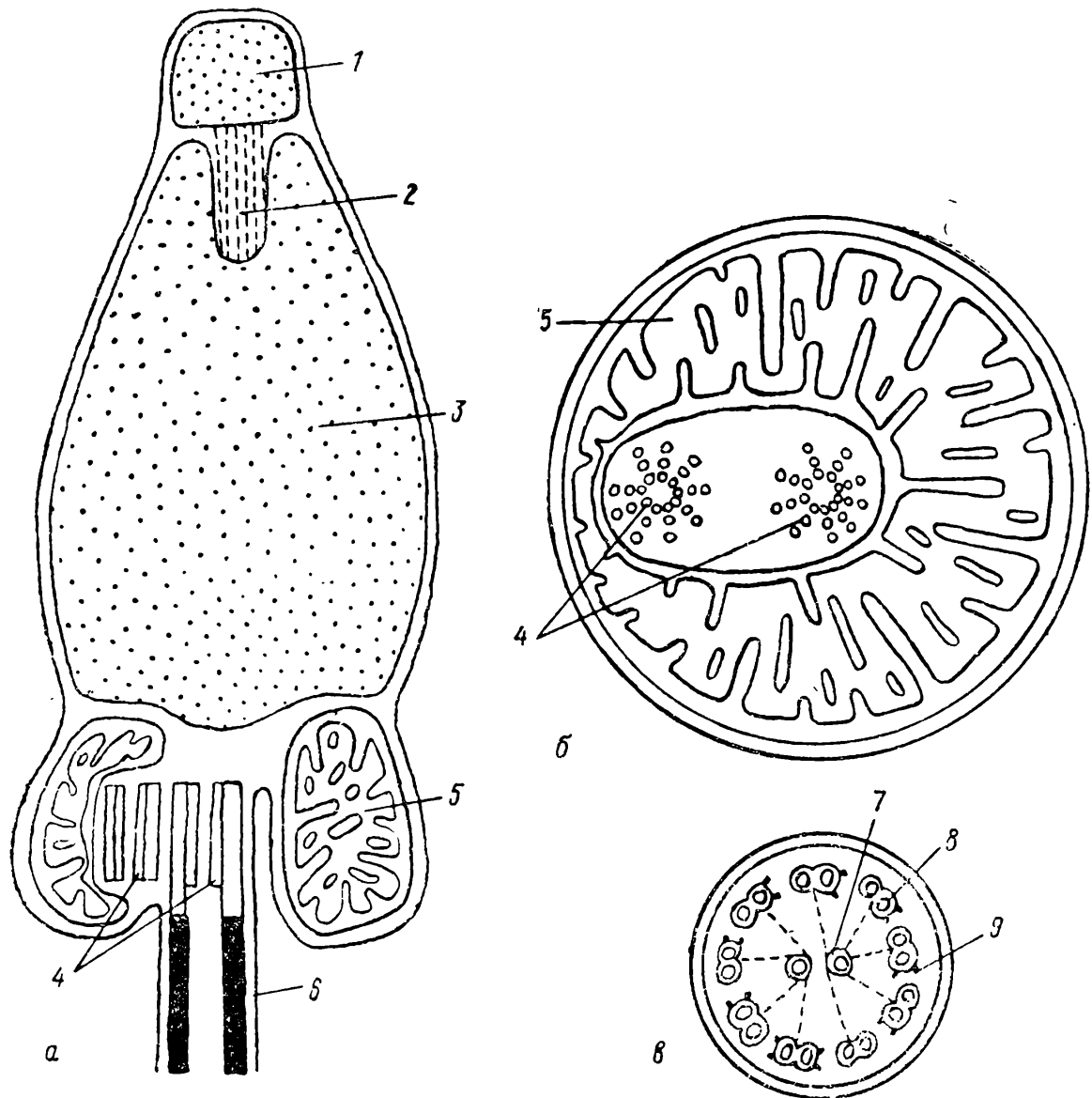


Рис. 6. Строение сперматозоида морского ежа по данным электронной микроскопии.

a — головка и промежуточный отдел, *б, в* — поперечные срезы промежуточного отдела в области centrioles (*б*) [Дроздов и Подгорная] и жгутика (*в*) (по: Afzelius из Гинзбург, 1968); 1 — акросомный пузырек, 2 — субакросомная область, 3 — ядро, 4 — centrioles, 5 — митохондрия, 6 — верхняя часть жгутика с фибриллами осевого комплекса, 7, 8 — центральные (7) и периферические (8) фибриллы, 9 — «ручки» периферических фибрилл.

Сперматозоиды, не имеющие флаголлоидной формы, относятся к группе «атипичных» — они бывают лишены жгута, а иногда акросомы и митохондрий. Предполагают, что форма атипичных сперматозоидов сопряжена с особенностями оплодотворения.

Сперматозоиды морской свинки. Строение сперматозоидов изучают на препаратах-мазках. В половом аппарате многих жи-

вотных и в том числе млекопитающих имеются стдеды для на копления и разжижения спермы — семенные пузырьки (см рис. 2), представляющие собой расширенную часть семепровода. Взятие спермы из семенных пузырьков гарантирует наличие в мазках только зрелых спермиев. Взвесь половых клеток для приготовления мазков можно также получить при тщательно измельчении семенника в физиологическом растворе (0,9%-ны раствор NaCl), подогретом до 37—40 °С. Однако в этом случае в мазках кроме зрелых сперматозоидов окажутся сперматогенные клетки более ранних этапов сперматогенеза и соматические клетки семенника. Используемая для мазков взвесь сперматозоидов не должна быть густой, чтобы избежать склеивания клеток. Степень разбавления ее физиологическим раствором контролируется под микроскопом.

Фиксацию материала проводят, прибавляя к 2—4 мл взвеси сперматозоидов 3—5 капель 2%-го раствора осмиевой кислоты (OsO_4) или неразбавленного формалина. После этого капли взвеси наносят на чисто вымытое предметное стекло; приложив к поверхности этого стекла под углом 30° другое стекло снаружи от нанесенной капли, быстро передвигают его скользящим движением, благодаря чему взвесь равномерно распределяется по стеклу. Затем этот препарат-мазок хорошо высушивают в термостате или, осторожно проводя его над пламенем спиртовки.

Другой способ состоит в фиксации взвеси сперматозоидов в парах осмия. Для этого стекло с нанесенной на него каплей взвеси сперматозоидов помещают над сосудом с осмиевой кислотой каплей вниз на 2—5 мин, избегая подсушивания капли. Для предотвращения вдыхания паров осмия следует проделать эту процедуру в вытяжном шкафу, или накрыв сосуды стеклянным колпаком. Затем уже описанным способом изготавливают мазок, высушивают его, заключают в бальзам под покровное стекло. Фиксация осмием одновременно служит и окраской для клеток.

В случае фиксации формалином или другими фиксаторами после высушивания препарат следует окрасить железным или квасцовым гематоксилином или сафранином со светлым зеленым, последний вариант дает дифференцированную окраску головки и хвоста сперматозоида. Перед окраской высушенный препарат следует ополоснуть в воде или физиологическом растворе для избавления от кристаллов солей фиксатора.

Мазки сперматозоидов следует рассматривать при большом или иммерсионном увеличении микроскопа. Спермии морской свинки имеют округлую, уплощенную головку с крупной акросомой, одевающей ядро сперматозоида в виде колпачка. На осмированных препаратах ядро выглядит светлым, а акросома окрашена в черный цвет (см. рис. 5, в). При окраске гематоксилином более интенсивно окрашивается ядро. Промежуточные

отдел спермия, в котором расположен клеточный центр и митохондрии, слегка утолщен. Длинная хвостовая нить постепенно истончается к концу. Иногда на препаратах наблюдаются «многохвостые» спермии, но это есть результат склеивания нескольких сперматозондов своими головками.

Сперматозоиды травяной лягушки. В сезон размножения (конец апреля, начало мая) сперматозоиды лягушки берут из семенных мешков, служащих резервуарами накопления зрелой спермы. Семенные мешки (или пузырьки) располагаются в нижней части полости тела самца и в период размножения имеют вид тонкостенных пузырей. В зимние месяцы в семенниках лягушек уже есть зрелые сперматозонды и мазки спермы можно получить, используя взвесь клеток, полученную измельчением семенника в физиологическом растворе. Сперму лягушки фиксируют и окрашивают так же, как и сперму морской свинки, но для ее разбавления следует использовать физиологический раствор для холоднокровных животных (0,75%-ный раствор NaCl).

Сперматозоиды лягушки имеют типичное строение (см. рис. 5, б). Длинная палочковидная головка на переднем конце несет продолговатую акросому, от противоположного конца головки отходит жгутик. Акросома, центриолы и митохондрии промежуточного отдела могут быть выявлены лишь специальными методиками.

Сперматозоиды аскариды. Мазки сперматозоидов можно изготовить, измельчив в физиологическом растворе нижнюю часть семепровода аскариды, в которой располагаются сперматозоиды.* Но для знакомства со строением сперматозоидов аскариды можно использовать и срезы через матку аскариды, в полости которой у осемененных самок между яйцеклетками располагаются и отдельные сперматозоиды.**

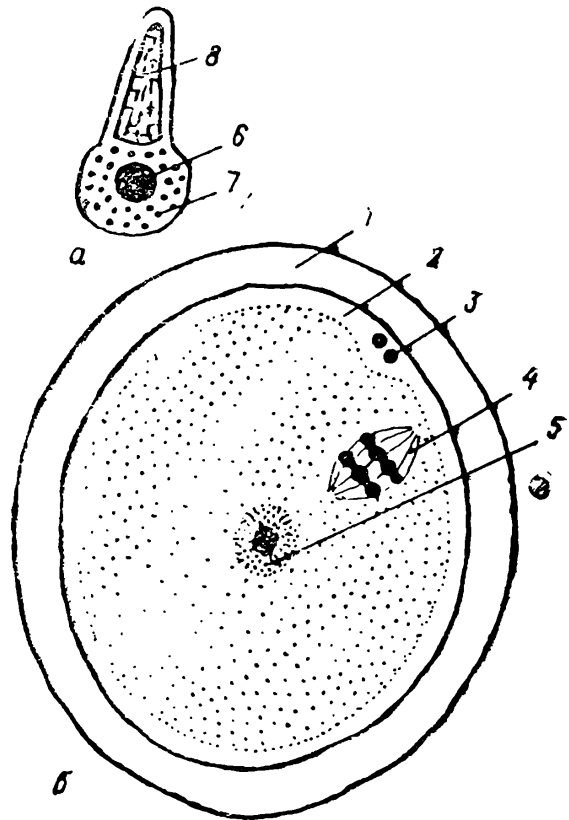


Рис. 7. Строение сперматозоида (а) [Шмидт, 1953] и второе деление созревания ооцита лошадиной аскариды (б). Ув. 7×90.

1 — белковая оболочка, 2 — перивителлиновое пространство, 3 — редуционные тельца, 4 — веретено II деления созревания, 5 — мужской пронуклеус, 6 — ядро сперматозоида, 7 — митохондрии, 8 — кристаллоид.

* О вскрытии аскариды — см. с. 56.

** Изготовление, фиксация и окраска мазков сперматозоидов см. с. 18.

Сперматозоиды аскариды имеют «атипичную» конусовидную форму (рис. 7, а); в расширенной части сперматозоида расположено небольшое компактное ядро, а вокруг него многочисленные митохондрии; в сужающейся конусовидной части находится плотное, преломляющее свет вещество, состоящее из особого белка аскаридина, синтезируемого сперматоцитами во время периода роста.

Сперматозоид речного рака *Astacius astacus* (L). Мазки спермиез речного рака изготавливают, используя содержимое семяпроводов либо взвесь клеток измельченного в физиологическом растворе (0,75-ный NaCl) семенника. Животных следует отлавливать ближе к периоду размножения — в конце лета или осенью. Семенник у речного рака расположен в головогрудь и лежит на спинной стороне над кишечником, поэтому животное следует вскрывать со спины. Семенник непарный, но его передняя часть раздвоена. Семяпроводы, отходя с двух сторон от непарной области семенника, образуют многочисленные петли и заметно утолщаются в дистальных отделах (рис. 8, а).

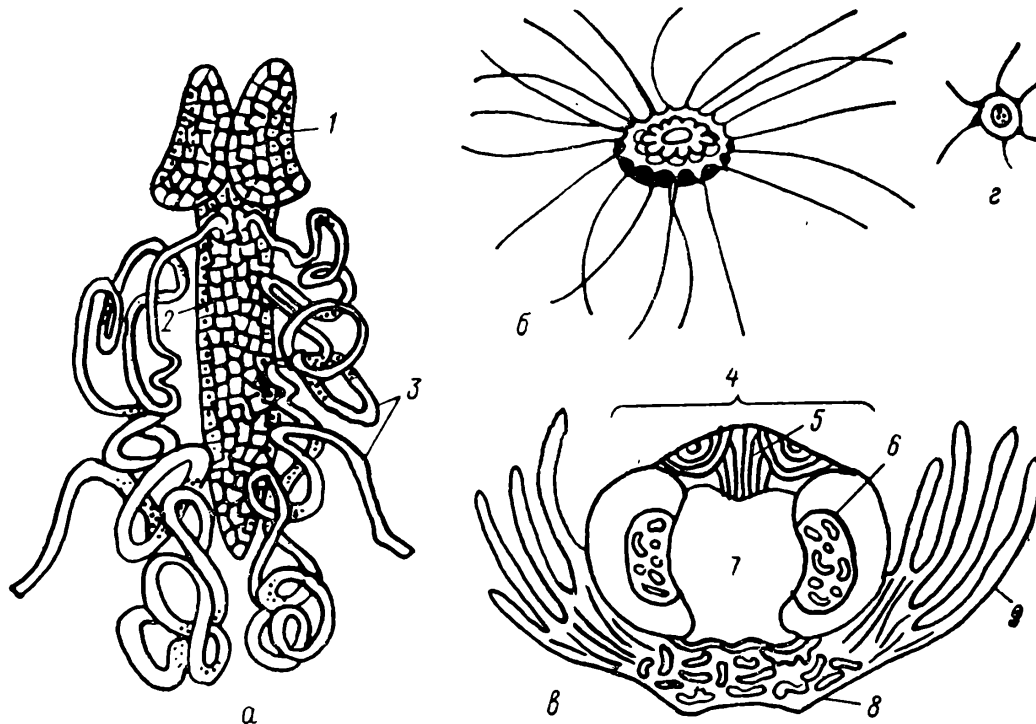


Рис. 8. Строение половой системы и сперматозоида речного рака. Ув. 7×90 .

а — мужская половая система речного рака [Иванов и др., 1958], б — схематическое изображение атипичного спермия речного рака [Шмидт, 1951], в — строение спермия речного рака по данным электронной микроскопии [Студицкий, 1981], г — спермий речного рака; 1, 2 — парная (1) и непарная (2) части семенника, 3 — семяпровод, 4 — акросома, 5 — замыкающая бляшка акросомы, 6 — кольцевидная структура акросомы, 7 — центральный цилиндр акросомы, 8 — ядро, 9 — радиальные отростки спермия.

Атипичные сперматозоиды речного рака имеют звездчатую форму. От центральной части сперматозоида лучеобразно отходят истончающиеся на концах длинные отростки (рис. 8, б, г). Верхняя выпуклая часть центрального диска представлена

акросомой, детали строения которой были уточнены электронно-микроскопическими исследованиями (рис. 8, в).

Под акросомой располагается уплощенное ядро, периферические части которого заходят в радиальные отростки. На препаратах спермии, как правило, расположены вверх акросомной частью, отростки обычно плохо сохраняются после фиксации, чаще всего видны лишь их участки, прилегающие к центральной области сперматозоида (рис. 8, г).

3. ООГЕНЕЗ

Оогенез имеет ряд отличий от сперматогенеза. Так, число гониальных делений в оогенезе меньше в пределах одного вида животных, чем в сперматогенезе; период роста длительнее, а увеличение объема ооцита I порядка значительнее, чем при росте сперматоцитов. Период роста ооцитов разделяют на период малого роста, в ходе которого рост незначителен, а в ядре ооцита осуществляется профазы мейоза вплоть до диплотены, и на период большого роста. Последний, в свою очередь, подразделяется на период цитоплазматического роста, во время которого возрастают объемы ядра и цитоплазмы и число органоидов — митохондрий, рибосом, мембран эндоплазматического ретикулума, элементов сетчатого аппарата, и период трофоплазматического роста, когда в ооплазме осуществляется накопление желтка (вителлогенез). В состав желтка входят белки, жиры и углеводы. Ядро ооцита в период большого роста находится на диплотенной стадии профазы мейоза. Хромосомный аппарат ооцита в период роста подвергается значительным изменениям. Диплотенные хромосомы преобразуются в хромосомы типа «ламповых щеток». Отдельные участки по длине таких хромосом деспирализуются, образуя петли, отходящие от хромомеров. Благодаря этому хромосома приобретает вид «ершика» или щетки для чистки ламповых стекол. На боковых петлях таких хромосом осуществляется транскрипция мРНК.

Усиливается функция ядрышка в синтезе рРНК, морфологически это выражается либо в увеличении его объема, либо в озрастании количества ядрышек на ядро.

Таким образом, в ходе роста в ооците накапливается значительный резерв РНК, используемый зародышем на ранних этапах развития. К концу периода роста петли «ламповых щеток» втягиваются, происходит инактивация синтетической активности диплотенных хромосом, которые образуют внутри ядра клубок — кариосферу; детали ее строения у разных животных варьируют. Сближение хромосом в кариосфере, по-видимому, облегчает формирование ими метафазной пластинки при переходе к первому делению созревания.

По завершении мейотических делений все резервные вещества, накопленные ооцитом в период роста, оказываются сосре-

доточенными в одной из четырех клеток, образовавшихся в результате двух делений созревания; именно эта клетка и становится яйцом, отделение трех редукционных телец связано с регуляцией ploидности яйца. Окончательную форму и величину ооцит приобретает в период роста, поэтому в оогенезе отсутствует этап, соответствующий периоду формирования в сперматогенезе.

При развитии ооцитов по солитарному типу, т. е. без участия вспомогательных элементов, питательные вещества попадают в развивающееся яйцо непосредственно из тканевых жидкостей в виде простых низкомолекулярных соединений. Образование более сложных веществ, входящих в состав желтка, и РНП происходит при активном участии синтетического аппарата самого ооцита. Взаимоотношения между яйцевыми клетками и организмом при солитарном оогенезе относительно просты. Солитарный оогенез встречается у некоторых кишечнополостных, червей, моллюсков; он распространен менее широко, чем алиментарный.

При алиментарном оогенезе развитие яйцеклеток происходит в контакте со специализированными клетками или тканями, выполняющими ряд вспомогательных функций. Основная из них — трофическая; она может проявляться либо в выработке вспомогательными клетками веществ, поступающих из них в ооцит, либо в контроле за поступлением веществ в ооцит из крови и тканевых жидкостей материнского организма. Кроме того, вспомогательные клетки могут выполнять в отношении гоноцитов гормонально-регуляторную, опорно-механическую, оболочко-образовательную, защитную и некоторые другие функции. Различают два вида алиментарного оогенеза: нутриментарный и фолликулярный. При нутриментарном оогенезе часть половых клеток превращается в трофоциты — клетки, питающие ооцит. В результате ряда делений исходного оогония формируется группа клеток, из которых лишь одна становится ооцитом, а остальные превращаются в трофоциты; все они соединены цитоплазматическими мостиками — фузомами, представляющими собой результат незавершенной цитотомии. Таким образом, группа клеток, состоящая из трофоцитов и ооцита представляет собой клеточный синцитий. Основная роль трофоцитов состоит в активном синтезе РНП для ооцита; установлено направленное перемещение по цитоплазматическим мостикам из трофоцитов в ооцит РНП, белков и некоторых органоидов (рибосом и, возможно, митохондрий). У ряда животных замечено повышение ploидности ядер трофоцитов. Кроме того, синтетический аппарат ядра ооцита при нутриментарном оогенезе во многих случаях бывает инактивирован; соответственно стадия кариосферы при этом часто более длительна, чем стадия «ламповых щеток», а ядрышко деградирует. Нутриментарный оогенез может дополняться развитием вокруг ооцита и

опутствующих ему трофоцитов фолликула, образованного фолликулярным эпителием. У тех насекомых, у которых имеется утритментарный оогенез, по существу, он сочетается с фолликулярным.

При фолликулярном оогенезе вспомогательную роль в отношении развивающегося ооцита играют соматические клетки, образующие вокруг него замкнутый фолликул, а половые клетки используются организмом в соответствии с их прямым назначением. Функции фолликулярного эпителия несравнимо более многообразны, чем функции трофоцитов при нутритментарном оогенезе. Фолликулярный эпителий избирательно проводит итательные вещества из соединительнотканной теки фолликула к ооциту. У некоторых животных обнаружена прямая цитоплазматическая связь фолликулярных клеток с ооцитами, напоминающая взаимоотношения ооцитов с трофоцитами (например, у чешуйчатых рептилий); в случае гибели ооцитов фолликулярные клетки участвуют в их резорбции активным фагоцитозом. Фолликулярный эпителий может выполнять эндокринные функции, участвовать в выработке яйцевых оболочек и т. д. Таким образом, фолликулярный эпителий представляет собой кань, лабильную в морфо-физиологическом отношении, строение и функционирование которой тесно коррелированы с различными «потребностями» ооцита на разных этапах его развития.

ОПИСАНИЕ ООГЕНЕЗА ПО ПРЕПАРАТАМ

Второе деление созревания в ооцитах лошадиной (*Ascaris quorum*) или свиной (*Ascaris suum*) аскариды. Для демонстрации мейотических делений и образования редукционных тел в оогенезе аскариды следует изготовить поперечные срезы верхней части матки, в полости которой находятся ооциты на стадии созревания.* Лучшие препараты получают при использовании лошадиной аскариды.

Осеменение у аскарид внутреннее. Сперматозоид внедряется в ооцит до начала мейотических делений. Ядро сперматозоида, проникшего в ооцит, превращается в мужской пронуклеус, который покоится в ооплазме до завершения ооцитом мейоза. После завершения делений созревания в ооците формируется женский пронуклеус и осуществляется кариогамия — слияние мужского и женского пронуклеусов.

На поперечном срезе через матку, в ее полости видно большое количество свободно расположенных ооцитов. Они одеты толстой и плотной белковой (третичной) оболочкой (рис. 7, б). Ооплазма яйцеклеток аскариды равномерно мелкогранулиро-

* О вскрытии аскариды, изготовлении и окраске препаратов половой системы см. с. 57.

вана (яйца аскарид относятся к изолецитальному типу). Для наблюдений и зарисовки нужно выбрать такой срез ооцита II порядка, на который попали мужской пронуклеус, первое редуccionное тельце и фигура второго деления созревания. Отличить ооцит II порядка от ооцита I порядка можно по наличию редуccionного тельца под оболочкой (однако отсутствие последнего может быть следствием того, что оно не попало в срез). Мужской пронуклеус располагается в центре ооцита и имеет вид темного тельца, в составе которого иногда можно различить спирализованные хромосомы. Гаплоидное число их у аскариды равно двум. Веретено второго деления созревания с хромосомами лежит близко к поверхности ооцита. Ось веретена обычно перпендикулярна поверхности ооцита. Часто обе хромосомы (на стадии метафазы) или хроматиды (на стадии ана- или телофазы) оказываются в плоскости одного среза. Первое редуccionное тельце находится в узком перивителлиновом пространстве под белковой оболочкой, недалеко от фигуры II деления созревания. Следует обратить внимание на разницу в величине редуccionного тельца и ооцита II порядка — продуктов первого мейотического деления.

Яичник приапулюса, *Priapulius caudatus*. Демонстрировать солитарный тип оогенеза можно на примере яичника *P. caudatus* (т. Nematelminthes, кл. Priapulida). Приапулюс в пределах нашей страны обитает в Баренцевом, Белом, Охотском и Японском морях. Это литоральная форма, встречающаяся на песчано-илистых пляжах, обнажающихся при отливах, или в мелководных бухтах с илистым дном. Черви живут, зарываясь в грунт, на дне трубковидных норок; животных откапывают лопатой или достают при драгировках. Собирают материал следует в летние месяцы. Приапулюсы раздельнополы, но внешний половой диморфизм у них не выражен.

Перед вскрытием животное умерщвляют, добавляя к воде небольшое количество спирта; вскрывают в физиологическом растворе под лупой. Яичники расположены в нижней трети полости тела, симметрично по бокам от кишечника. Отпрепарированный яичник фиксируют в жидкостях Карнуа или Буэна (10-15 мин). После обезвоживания кусочки яичника заливают в парафин, проводя через хлороформ. Препараты окрашивают квасцовым или железным гематоксилином с докраской эозином или светлым зеленым. Яичник приапулюса состоит из большого количества овариальных мешочков, расположенных между кишечником и уrogenитальным каналом, просвет которого находится в прямой связи с полостью каждого овариального мешочка. Стенка овариальных мешочков состоит из однослойного эпителия, в составе которого находятся ресничные и половые (на разных стадиях оогенеза) клетки. Эпителий отграничен от полости тела базальной мембраной.

В оогониях, расположенных в стенке овариальных мешоч-

ков, различимы гониальные митозы, более крупные клетки разной величины в стенке гонады представляют собой ооциты I порядка на разных этапах роста (рис. 9). Центральное положение в ооците занимает ядро, в некоторых ооцитах оно не видно, так как оказывается вне среза. Обращает на себя внимание большое ядрышко, характерное для ооцитов при солитарном оогенезе. Ооплазма мелких ооцитов гомогенна. В крупных — видны равномерно расположенные гранулы желтка, что свойственно яйцам изолецитального типа. Растущие ооциты в связи с увеличением их объема выпячиваются в полость тела над поверхностью овариального мешочка; наиболее крупные из них сохраняют связь со стенкой гонады лишь узким основанием (участок, соединяющий ооцит с яйчником, не всегда оказывается в плоскости среза, что создает ложное впечатление свободного расположения некоторых ооцитов в полости тела). Базальная мембрана герминативного эпителия продолжается и на поверхность ооцитов, выступающих в полость тела, отделяя их от полостной жидкости, из которой в них поступают питательные вещества. Клеток, выполняющих вспомогательные функции в отношении развивающихся ооцитов, в яичнике приапюлюса нет. При овуляции яйцо раздвигает клетки эпителия гонады и выходит в ее полость, а оттуда в уrogenитальный канал, через который выводится во внешнюю среду.

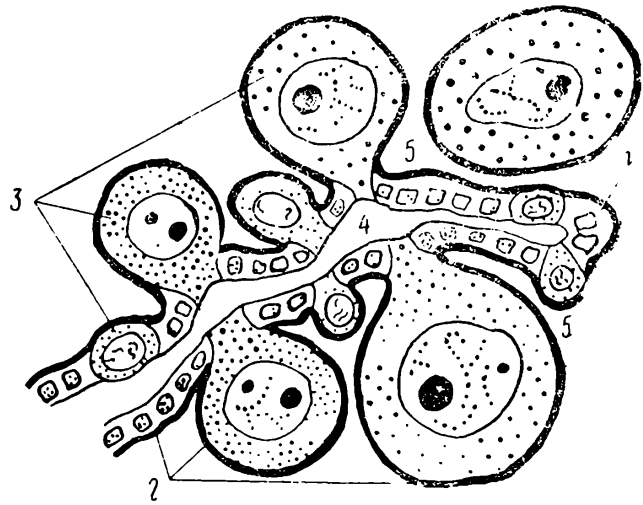


Рис. 9. Участок яичника приапюлюса (*Priapulus caudatus*). Фрагмент овариального мешочка. Ув. 7×90.

1 — эпителиальная стенка овариального мешочка, 2 — базальная мембрана эпителия, 3 — ооциты I порядка на разных стадиях роста, 4 — полость овариального мешочка, 5 — полость тела.

Яйцевая трубочка кобылки, *Stenobothrus nigromaculatus* (тотальный препарат). Для знакомства с алиментарным фолликулярным оогенезом беспозвоночных можно использовать яичник кобылки — насекомого из отряда прямокрылых. Самок следует отловить в первой половине лета (июнь-июль). Умерщвляют насекомое эфиром, удаляют надкрылья и крылья, прикрепляют булавками к восковому дну ванночки спиной вверх. Вскрытие проводят в физиологическом растворе (0,75%-ный раствор NaCl). Яичник насекомых представлен двумя пучками яйцевых трубочек, расположенных в нижней половине брюшка. Отпрепарованные яичники помещают в часовое стекло с физиологическим раствором и с помощью иголок расчлениают на составляющие их яйцевые трубки — овариолы, из ко-

рых

торых изготавливают тотальные препараты. На распрямленные на предметном стекле яйцевые трубочки капают смесь Карнуа или Буэна. Через 3—5 мин уже можно перенести овариолы в сосуд с фиксатором, при этом они остаются расправленными. В смеси Карнуа фиксируют 10—15 мин, в смеси Буэна материал может сохраняться длительное время. После отмывки от фиксатора подкрашивают яйцевые трубочки гематоксилином или борным кармином, проводят через ряд спиртов возрастающей концентрации, карбол—ксилол, ксилол (в каждом держат по 10-15 мин) и целиком заключают в бальзам, по 2-3 трубочки под одно стекло. Под края покровного стекла рекомендуется поместить квадратики толстой бумаги или осколки покровного стекла, чтобы избежать раздавливания объекта.

Рассматривая препарат, в составе овариолы следует отметить три части (рис. 10, а): передний тонкий участок — прикрепительный филамент, следующую за ним утолщенную часть — гермарий, область локализации оогониев и префолликулярных клеток, и постепенно расширяющуюся часть яйцевой трубочки — вителлярый, в котором располагаются яйцевые фолликулы. Завершившие деления гонии превращаются в ооциты I порядка, приступают к росту и, одеваясь фолликулярным эпителием, перемещаются из гермария в вителлярый. Фолликулы с самыми крупными ооцитами наиболее удалены от гермария. Для более подробных наблюдений следует выбрать один из фолликулов крупного размера. При большом увеличении микроскопа, меняя фокусировку, можно увидеть клетки фолликулярного эпителия и убедиться в центральном расположении ядра и в равномерном расположении желточных включений в ооците (яйца насекомых относятся к централецитальному типу). Сравнивая ооциты разных фолликулов, нужно обратить внимание на увеличение их объема по мере удаления от гермария, связанное с ростом и накоплением в них желтка. По завершении вителлогенеза фолликулярный эпителий выделяет на поверхность ооцита хорион — вторичную оболочку яйца. Яйцевые трубочки описанного типа, в фолликулах которых содержатся ооциты, а трофоциты отсутствуют, называются паностическими.

Яйцевая трубочка жука-плавунца, *Dityscus marginalis* (тотальный препарат). С нутриментарным типом оогенеза можно ознакомиться на примере яичника жука-плавунца. Плавунцов отлавливают в первой половине лета в водоемах со стоячей водой.

В составе овариолы различимы прикрепительный филамент луковицеобразный гермарий и наиболее длинный участок овариолы — вителлярый, расширяющийся книзу. Внутри каждого яйцевого фолликула располагается группа из 16 клеток; одна, наиболее крупная из них, — ооцит, остальные 15 — трофоциты 16 клеток, расположенных внутри каждого из фолликулов яич-

ника, у плавунца возникают в результате четырех делений одного исходного гония (рис. 10, б). В световом микроскопе увидеть цитоплазматические мостики, соединяющие трофоциты друг с другом и с ооцитом, не удастся. В фолликулах прокси-

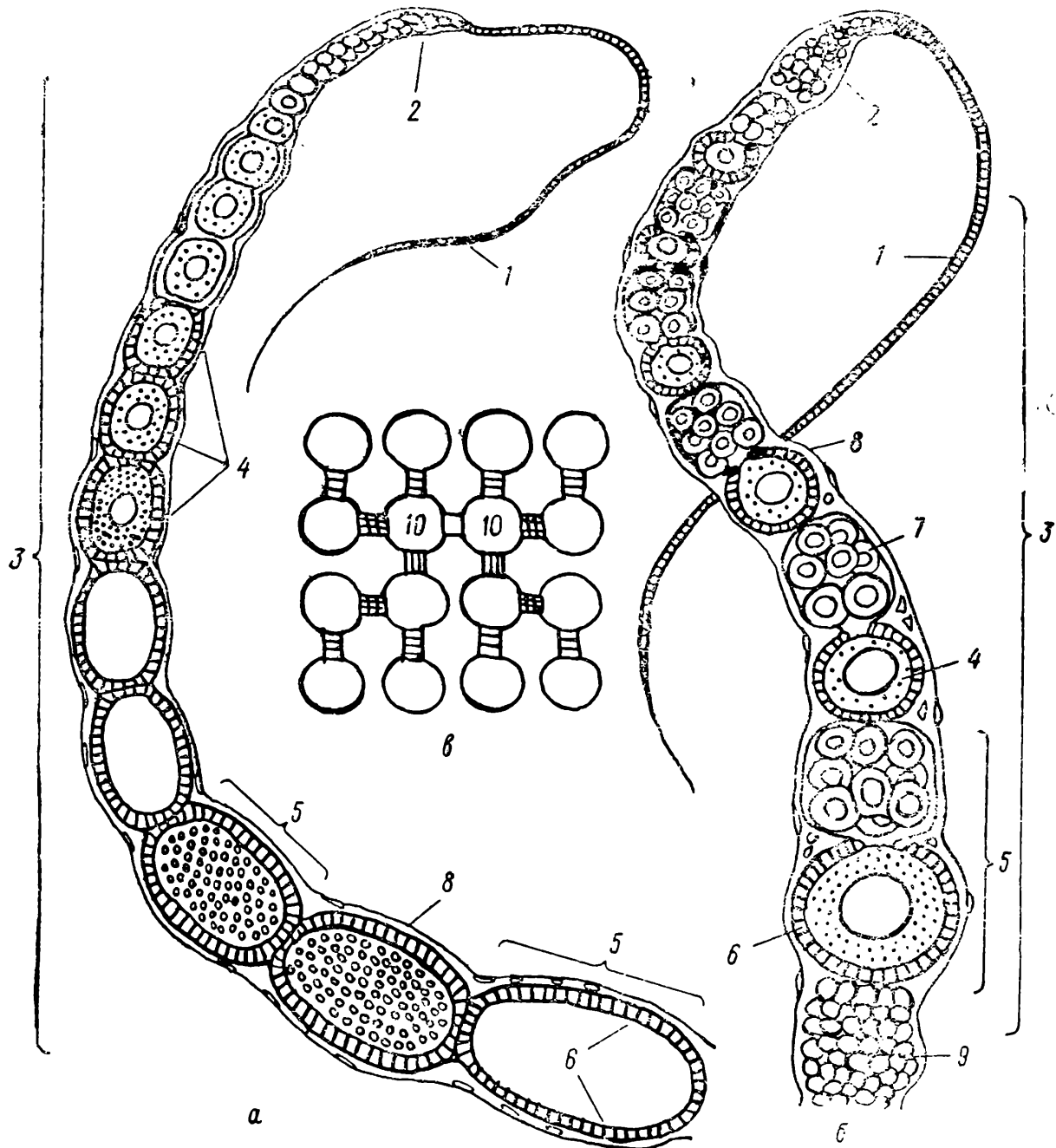


Рис. 10. Яйцевые трубочки насекомых. Ув. $\times 10$.

а — кобылки, *Stenobothrus nigromaculatus*, б — жука-плавунца, *Dityscus marginalis*, в — схема расположения цитоплазматических мостиков между половой клеткой и трофоцитами в составе фолликула политрофической овариолы дрозофилы [Кох]; 1 — прикрепительный филамент, 2 — гермарий, 3 — вителлярый, 4 — ооциты I порядка, 5 — фолликул, 6 — фолликулярный эпителий, 7 — трофоциты, 8 — оболочка овариолы, 9 — резорбирующийся фолликул, 10 — прооциты.

мальной части овариолы ооциты близки по размерам к трофоцитам, в дистальной, в связи с прогрессирующим ростом, ооциты все более превосходят по величине сопутствующие им трофоциты. В каждом фолликуле ооцит занимает дистальное

положение, группа трофоцитов — проксимальное. Клетки фолликулярного эпителия, образующие стенку фолликула, хорошо различимы в более крупных фолликулах, где они имеют в области контакта с ооцитом столбчатую форму, тогда как в части, окружающей трофоциты, сильно уплощены и различимы с трудом. Яйцевые трубочки насекомых, каждый фолликул которых содержит ооцит и группу трофоцитов, называются политрофическими.

Яичник лягушки, *Rana temporaria* (срез). Доступным материалом для знакомства с периодом роста в оогенезе позвоночных служит яичник травяной лягушки. Рост ооцитов у лягушки осуществляется в течение трех лет, таким образом, в яичнике всегда имеются половые клетки разных этапов оогенеза. На этом же материале можно продемонстрировать хромосомы типа «ламповых щеток» и кариосферу в ядрах диплонтных ооцитов, разные этапы развития желточной оболочки яйца, а также кортикальные гранулы. Гониальные деления и ранние профазные изменения ядра, не имеющие принципиальных различий в оо- и сперматогенезе, удобнее изучать на примере сперматогенеза (см. раздел 2).

Фиксацию яичника лягушки следует провести в июне или июле, когда в нем отсутствуют крупные завершившие рост ооциты (большое количество таких ооцитов в яичниках осенне-зимних лягушек маскирует ооциты более ранних этапов роста). Но можно использовать и яичники зимних лягушек, если предварительно освободить их от поздних ооцитов, вызвав овуляцию методом гипофизарной инъекции (см. гл. 9). Объем фиксируемых кусочков должен быть не более кубического сантиметра. Для изготовления препаратов рекомендуется фиксация яичников в смеси Буэна и обычная проводка через хлороформ в парафин, изготовление срезов толщиной 7—8 мкм, окраска квасцовым или железным гематоксилином с докраской эозином.

Для выявления кортикальных гранул и желточной оболочки ооцитов следует предварительно провести окраску срезов яичника по методу Готчкиса, специфически выявляющему мукополисахариды, входящие в состав названных структур (см. руководство по Микроскопической технике).

Яичник лягушки представляет собой лопастной мешковидный орган, в стенке которого между его наружным эпителиальным и внутренним соединительнотканым слоями расположены оогонии и яйцевые фолликулы. Островки оогониев можно видеть в некоторых участках близ поверхности яичника (рис. 11). Для покоящихся оогониев характерна лопастная форма ядра, хроматин сетчатой структуры, слабобазофильная цитоплазма. Между оогониями вкраплены отдельные префолликулярные клетки уплощенной или конусовидной формы, из которых впоследствии развивается фолликулярный эпителий. Оого-

нии следует рассматривать, пользуясь иммерсионным объективом. Вступившие в рост ооциты одеты фолликулярным эпителием и соединительнотканной текой. На препарате видны фолликулы с ооцитами I порядка, находящимися на разных этапах роста. Мелкие ооциты имеют базофильную вакуолизированную ооплазму, в более крупных (в связи с активным накоплением

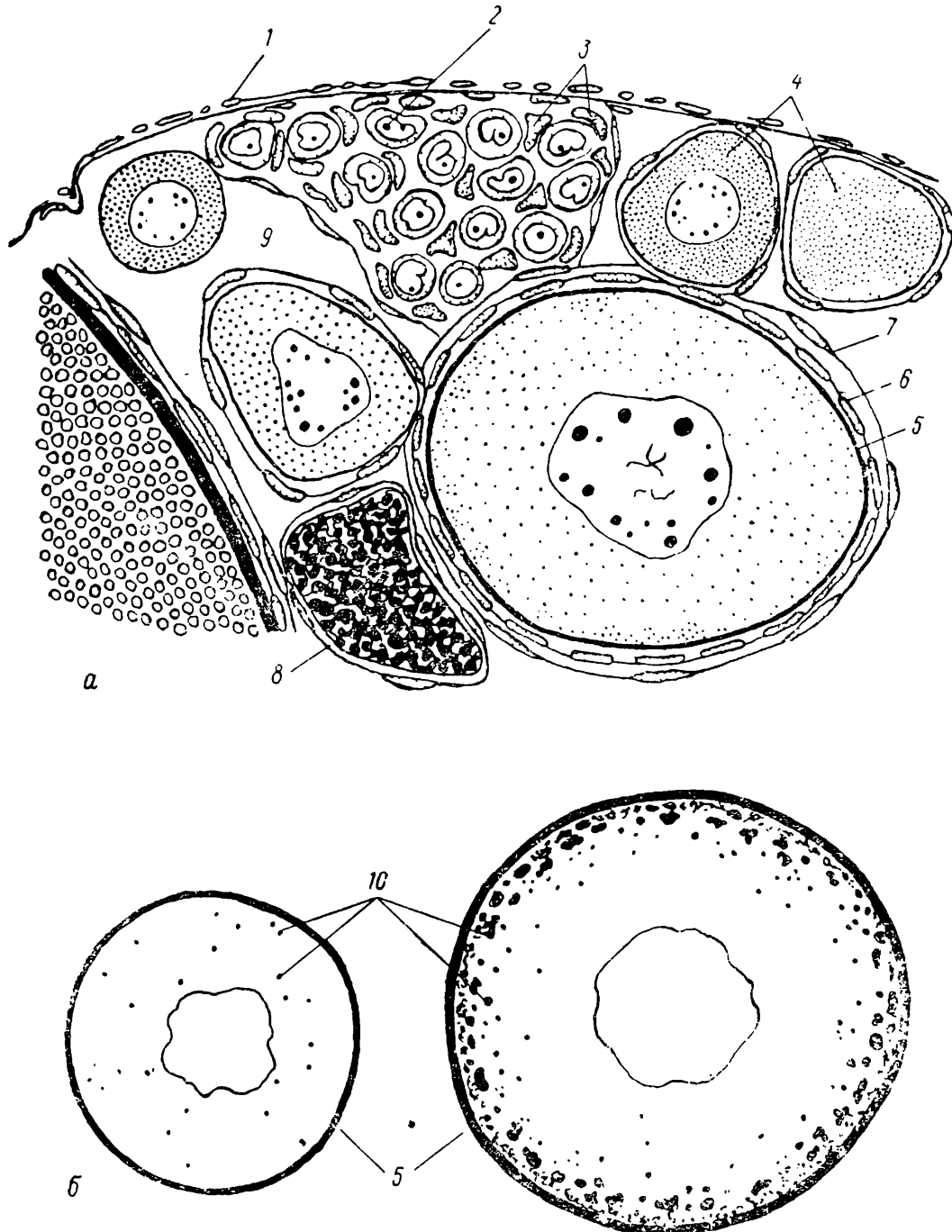


Рис. 11. Участок яичника травяной лягушки, *Rana temporaria* (а), и желточная оболочка ооцитов I порядка на разных этапах роста при специфическом выявлении мукополисахаридов (б). Ув. 7×40 .

— эпителиальный покров яичника, 2 — оогонии, 3 — префолликулярные клетки, 4 — ооциты I порядка, 5 — желточная оболочка, 6 — фолликулярный эпителий, 7 — соединительнотканная тека фолликула, 8 — резорбирующийся фолликул, 9 — полость яичника, 10 — кортикальные гранулы.

желтка) — ооплазма менее базофильна. Крупные ядра ооцитов имеют неровный контур и гомогенную кариоплазму, в которой расположены многочисленные ядрышки. В ядрах более крупных ооцитов, зафиксированных в июне—июле, можно видеть хромосомы типа ламповых щеток (см. с. 21; рис. 12, а). Для получения

препаратов с ооцитами, содержащими в ядре кариосферу (рис. 12, б), яичник следует фиксировать в ноябре-январе.

На препаратах, окрашенных по методу Готчкисса, желточная оболочка и кортикальные гранулы ооцитов, содержащие мукополисахариды, избирательно окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. Можно видеть разные этапы формирования желточной оболочки — тонкой у ооцитов малого диаметра и утолщающейся по мере роста ооцита. Эта же методика позволяет наблюдать накопление в ооплазме кортикальных гранул (см. с. 162), которые по мере роста ооцитов концентрируются в кортикальной ооплазме (рис. 11, б).

Яичник крысы или мыши (срез). Срезы яичника крысы могут послужить для знакомства с олиголецитальными яйцами млекопитающих и для демонстрации фолликулярного типа оогенеза. Фиксировать яичники следует в смесях Буэ

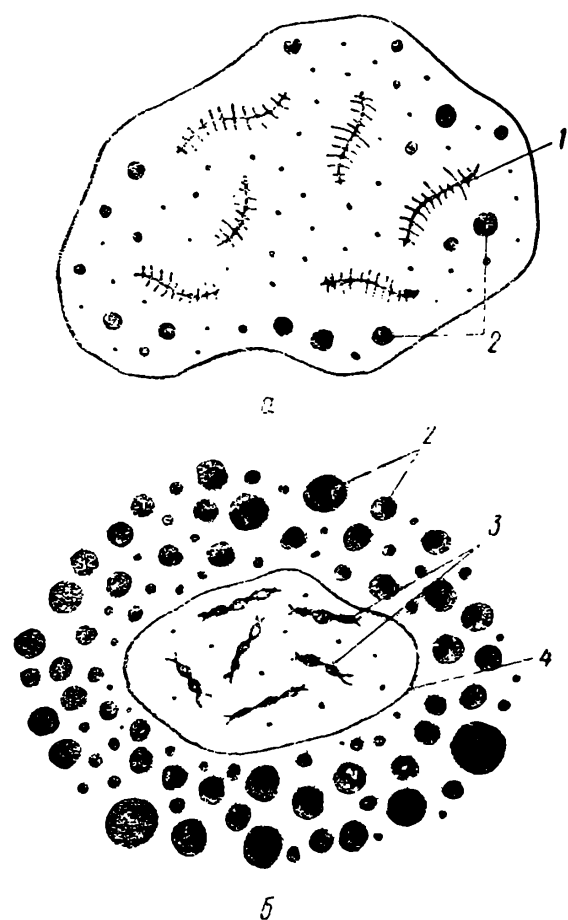


Рис. 12. Ядерные структуры дипло-
тенных ооцитов травяной лягушки.
Ув. 7×40.

а — ядро ооцита I порядка на средних этапах роста, б — кариосфера из ядра ооцита I порядка в конце периода роста; 1 — хромосомы типа «ламповых щеток», 2 — ядрышки, 3 — хромосомы, окруженные капсулой кариосферы (4).

на или Ценкера, залить в парафин, проведя через карбол-ксилол и ксилол, изготовить срезы толщиной 6—7 мкм, окрасить их гематоксилином с эозином.

На препарате видно, что яичник млекопитающих — это плотный орган, строма которого представлена соединительнотканью. В корковом слое яичника располагаются яйцевые фолликулы с заключенными в них ооцитами на разных этапах роста (рис. 13, а). Стенка яйцевых фолликулов образована соединительнотканной текой, в которой разветвляются капилляры, питающие фолликул, и фолликулярным эпителием. На границе теки с фолликулярным эпителием расположена базальная мембрана. По мере развития фолликула его эпителий из одно-

слойного становится многослойным, таким образом, в фолликулах, содержащих ооциты разного возраста, количество слоев клеток в фолликулярном эпителии неодинаково. Клетки в ба-

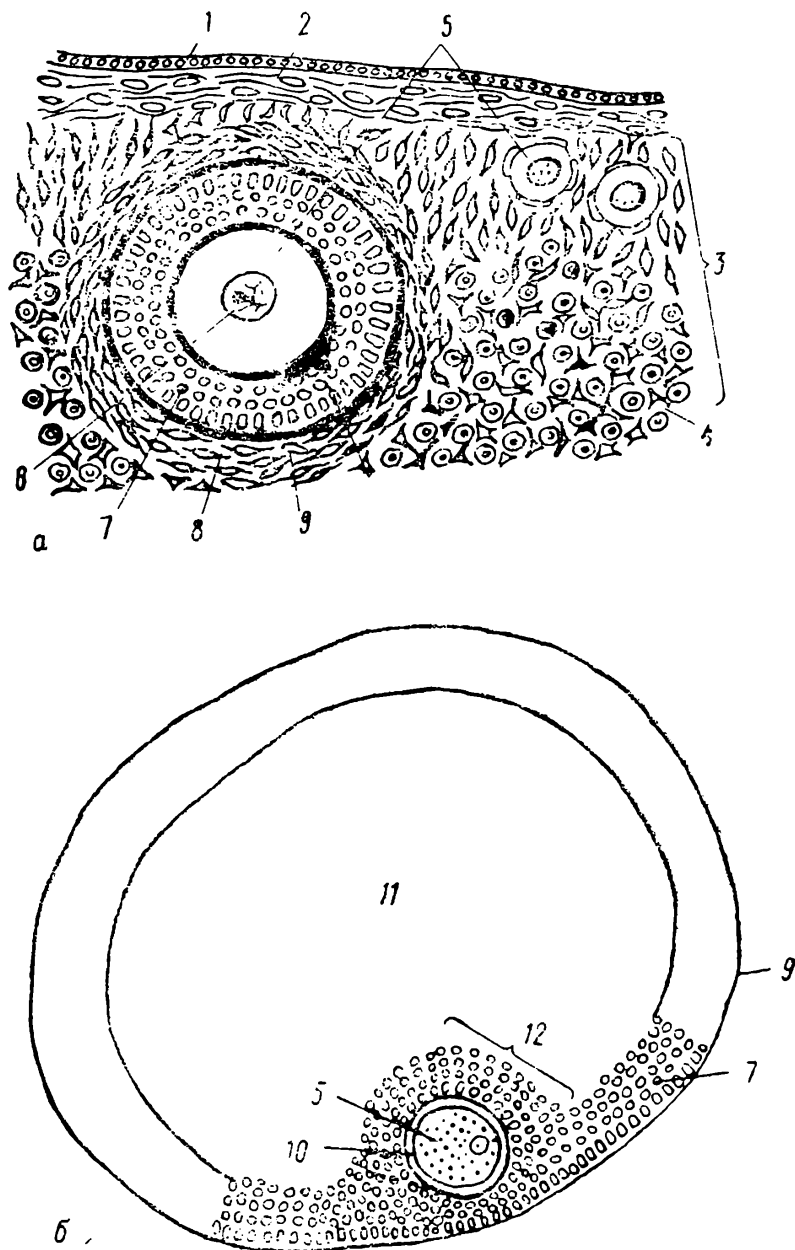


Рис. 13. Участок коркового слоя яичника белой крысы с фолликулами разного возраста (а) и строение полостного фолликула — Граафова пузырька (б). Ув. 7×10 .

1 — целомический эпителий, покрывающий яичник, 2 — белочная оболочка, 3 — корковое вещество яичника, 4 — интерстициальная ткань, 5 — ооциты I порядка, 6 — ядро ооцита, 7 — фолликулярный эпителий, 8 — соединительнотканная тека фолликула, 9 — базальная мембрана фолликулярного эпителия, 10 — zona pellucida (прозрачная яйцевая оболочка), 11 — полость Граафова пузырька, 12 — яйценосный бугорок.

зальном слое эпителия цилиндрической формы, в вышележащих слоях — неправильной отростчатой. К моменту образования многослойного фолликула ооцит достигает максимальной величины — 70—80 мкм в диаметре. В толще эпителия по мере ро-

ста фолликула появляется полость, которая оттесняет ооцит с несколькими слоями одевающих его фолликулярных клеток в эксцентрическое положение. Часть стенки фолликула, выступающая в его полость и содержащая ооцит, называется яйценосным бугорком. Именно такой фолликул с хорошо развитой полостью (Граафов пузырек) следует избрать для рассмотрения при большом увеличении (рис. 13, б).

У крысы размножение оогониев заканчивается в эмбриональном периоде, и в яичнике половозрелого животного можно встретить только ооциты I порядка на диплотенной стадии профазы мейоза. Ядро ооцита содержит ядрышко, хромосомы очень мелкие, поэтому с трудом обнаруживаются на обычных препаратах. Ооплазма равномерно гранулирована, желтка мало, он сильно диспергирован и поэтому на препаратах не виден. Почти полное отсутствие желтка и небольшая величина яиц у млекопитающих — вторичные явления, отражающие приспособления плацентарных млекопитающих к внутриутробному развитию. На поверхности ооцита видна вторичная яйцевая оболочка, сформированная при участии клеток фолликулярного эпителия, она называется блестящей или прозрачной оболочкой (*zona pellucida*). Она пронизана отростками фолликулярного эпителия и микроворсинками, отходящими от поверхности ооцита, однако в световом микроскопе они не видны. На хороших препаратах удастся рассмотреть радиальную исчерченность яйцевой оболочки, обусловленную прохождением через нее канальцев, содержащих отростки фолликулярных клеток.

Овуляция у млекопитающих чаще всего осуществляется на стадии метафазы I—II делений созревания.

СТРОЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ЯЙЦЕКЛЕТОК

Яйцевые клетки в связи с их функциями в размножении имеют ряд специфических черт строения, возникающих в ходе оогенеза. Одна из особенностей зрелых яиц — их большая, в сравнении с другими клетками организма, величина и смещение ядерно-цитоплазматического отношения в сторону увеличения цитоплазмы. Возрастание объема яйца главным образом связано с накоплением в ооплазме резервных веществ (желтка, РНП), используемых в ходе эмбриогенеза. Количество желтка в яйце обычно соответствует характеру развития. У животных с первичным личиночным развитием яйца содержат небольшое количество желтка (кишечнополостные, иглокожие). При прямом развитии эмбриогенез завершается формированием более сложного организма, чем личинка; развитие в яйце длительнее и требует больших энергетических затрат; яйца таких животных содержат большее количество желтка (рептилии, птицы). При внутриутробном развитии желток в яйце почти по-

ностью отсутствует, зародыш питается за счет материнского организма (плацентарные млекопитающие).

Количество и расположение желтка в яйцах положено в основу их классификации: яйца с небольшим количеством желтка, лежащим равномерно, называют изолецитальными (например, у иглокожих). Яйцеклетки с большим количеством желтка, основная масса которого расположена в вегетативной области, называют телолецитальными (например, у рыб, амфибий и птиц). Яйца с большим количеством желтка, занимающим в них центральную часть, именуют центролецитальными (у членистоногих). Яйца, почти лишенные желтка, — алецитальными (у плацентарных млекопитающих). При более общей классификации различают яйца многожелтковые (полилецитальные), со средним количеством желтка (мезолецитальные) и маложелтковые (олиголецитальные).

Яйцеклетки имеют более или менее четко выраженную полярность, морфологически это выражается в расположении ядра, органоидов, желтка и пигмента. Полюс яйца, ближе к которому лежит ядро, называют анимальным, противолежащий ему — вегетативным. В яйцах, лишенных видимой полярности, анимальным полюсом принято считать место отделения полярных телец. У многих животных полярность яйца находится в определенном отношении с главными морфологическими осями будущего зародыша и дефинитивного организма и, таким образом, представляет собой одно из выражений проморфологии.

В яйцах животных с моноспермным оплодотворением в поверхностном слое ооплазмы содержатся кортикальные гранулы — специфический органоид, участвующий в предотвращении полиспермии. При оплодотворении происходит разрушение кортикальных гранул, их содержимое освобождается в перивителлиновое пространство, участвуя в образовании оболочки оплодотворения, блокирующей полиспермию.

К особенностям яиц следует также отнести наличие специализированных яйцевых оболочек, защищающих зародышей от различных биотических и абиотических факторов среды, от высыхания, служащих часто для прикрепления яйца к субстрату и т. д. Классификация яйцевых оболочек основана на способе их образования; оболочки могут выделяться самим яйцом — первичные, клетками фолликулярного эпителия яичников — вторичные, эпителием, выстилающим половые пути самки — третичные. Присутствие всех трех оболочек на поверхности яйца не обязательно; строение их соответствует условиям развития зародыша. У яйцекладущих животных оболочки яиц обычно хорошо развиты и разнообразны по строению, у живородящих — в значительной степени редуцированы.

Яйцо лягушки, *Rana temporaria*. Яйца могут быть получены либо в конце апреля — начале мая при вскрытии самок, когда

икра после овуляции скапливается в нижних частях яйцеводов, либо могут быть собраны в водоемах в период икрометания. Зимой зрелые яйца лягушек получают с помощью метода гипофизарных инъекций (см. с. 158).

Яйца можно рассмотреть прижизненно или заготовив, впрок, зафиксировав в 10%-ном формалине; перед занятием материал отмывают от формалина в проточной воде 12—24 ч.

Рассматривая икринку, обратить внимание на толстую, прозрачную студенистую (третичную) оболочку яйца. Если яйца взяты из яйцевода, то, поместив их в воду, можно наблюдать набухание студенистых оболочек вследствие их обводнения. Студенистая оболочка предохраняет зародыш от высыхания, механических повреждений, инфекций и других неблагоприятных воздействий.

Телolecитальное яйцо лягушки имеет четкую полярность, в ооплазме анимального полушария содержатся гранулы пигмента меланина, вегетативная область яйца лишена пигментации (рис. 14). Полярность отражена и во внутреннем строении яй-

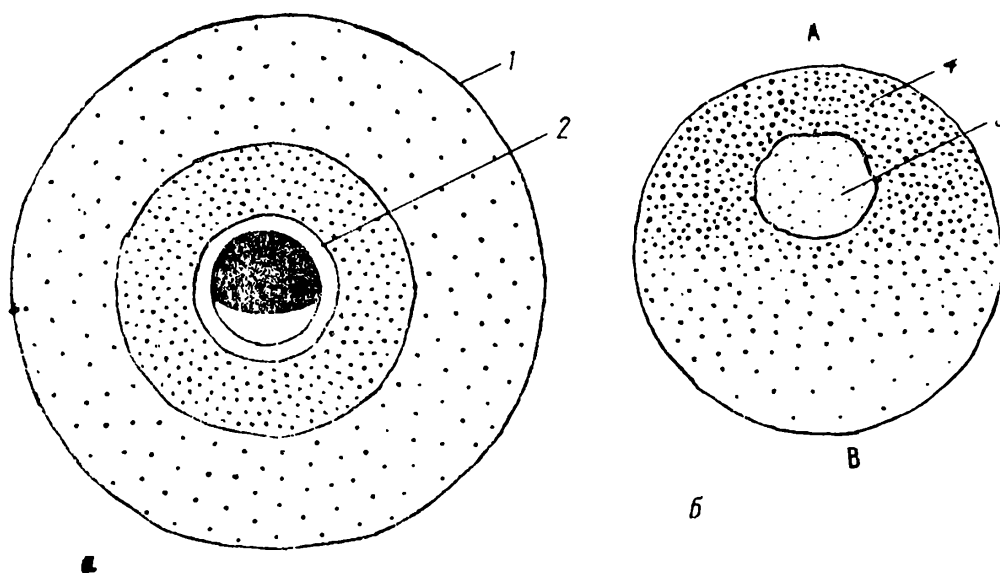


Рис. 14. Отложенное яйцо лягушки в яйцевых оболочках (а) [Шмидт, 1951] и ооцит лягушки, разрезанный в анимально-вегетативном направлении (б).

1 — студенистая оболочка яйца, 2 — перивителлиновое пространство, 3 — ядро, 4 — гранулы пигмента, А — анимальный полюс, В — вегетативный полюс.

ца — при разрезе, проведенном в анимально-вегетативном направлении, на постоянных или временных препаратах (см. ниже) видно, что ядро располагается вблизи анимального полюса, более крупные гранулы желтка сосредоточены в вегетативном полушарии, а пигмент занимает лишь анимальную область (рис. 14, а). Для того чтобы убедиться в этом, в один из зимних месяцев следует, вырезав участок яичника лягушки, оплоскать его крутым кипятком или сварить, что способствует уплотнению содержимого яйцеклеток. После этого, отделив один из

крупных ооцитов, разрезать его бритвой точно в анимально-вегетативном направлении. Отделив половинки яйца друг от друга, можно рассмотреть его внутреннее строение под лупой (рис. 14, б). При этом следует помнить, что готовые к овуляции яйца лягушки — это ооциты II порядка; овуляция происходит на стадии II деления созревания.

Строение отложенного яйца курицы. Телолецитальное яйцо курицы во много раз превосходит по величине яйцо лягушки (собственно яйцеклеткой в яйце курицы является «желток»). Возрастание полилецитальности у птиц связано с переходом *Amniota* к прямому развитию. Яйцо курицы весьма демонстративно как пример усовершенствования третичных яйцевых оболочек в связи с переходом *Amniota* к наземному развитию. Оплодотворение у птиц происходит в верхней части яйцевода, после чего сразу начинается развитие зародыша, поэтому бластодиск отложенного яйца представляет собой зародыш уже на стадии ранней гастролы. В отложенном яйце курицы, согласно правилу Бэра, можно определить оси тела формирующегося зародыша. Для этого следует расположить перед собой яйцо влево тупым концом, вправо острым; тогда, если бластодиск будет находиться сверху, головной конец зародыша окажется направленным в сторону от наблюдателя, а хвостовой — к нему. Однако это правило справедливо лишь в 70—80% случаев.

Строение яйца курицы удобно рассмотреть, разбив скорлупу и вылив содержимое в чашку Петри; при этом с помощью шпателя следует осторожно повернуть желток вверх зародышевым диском, имеющим вид белого матового кружка. Место расположения зародышевого диска соответствует анимальному полюсу яйца; до оплодотворения в этой области телолецитальной яйцеклетки птиц располагается ядро.

Разобраться в строении яйцевых оболочек можно, пользуясь схемой на рис. 15. Внутренняя из яйцевых оболочек, имеющая вид тонкой пленки на поверхности «желтка», представляет собой совокупность первичной желточной и вторичной оболочек. Убедиться в двуслойности этой оболочки можно лишь на гистологических препаратах. На поверхности желточной оболочки расположен слой уплотненного халазиферного белка, от которого несколько выше экватора яйца отходят два плотных шнура — халазы, другим концом закрепленные в более периферическом слое плотного белка. Между халазиферным и плотным слоями находится жидкий белок, в котором яйцо оказывается подвешенным на халазах. Так как халазы прикреплены к яйцу несколько выше экватора, то при поворотах яйца анимальная область его с зародышевым диском всегда оказывается повернутой вверх, она лучше аэрируется, находится ближе к телу наседки и при насиживании лучше обогревается. Снаружи от плотного белка находится еще один слой жидкого белка, расположенный в виде «муфты». Далее следуют две плот-

ные, волокнистые подскорлуповые оболочки, выстилающие скорлупу изнутри; у тупого конца отложенного яйца они расходятся, образуя воздушную камеру. Плотная известковая, пронизанная порами скорлупа с поверхности одета тонким слоем вещества углеводной природы — кутикулой. Белковые, подскорлуповые и скорлуповая оболочки являются третичными.

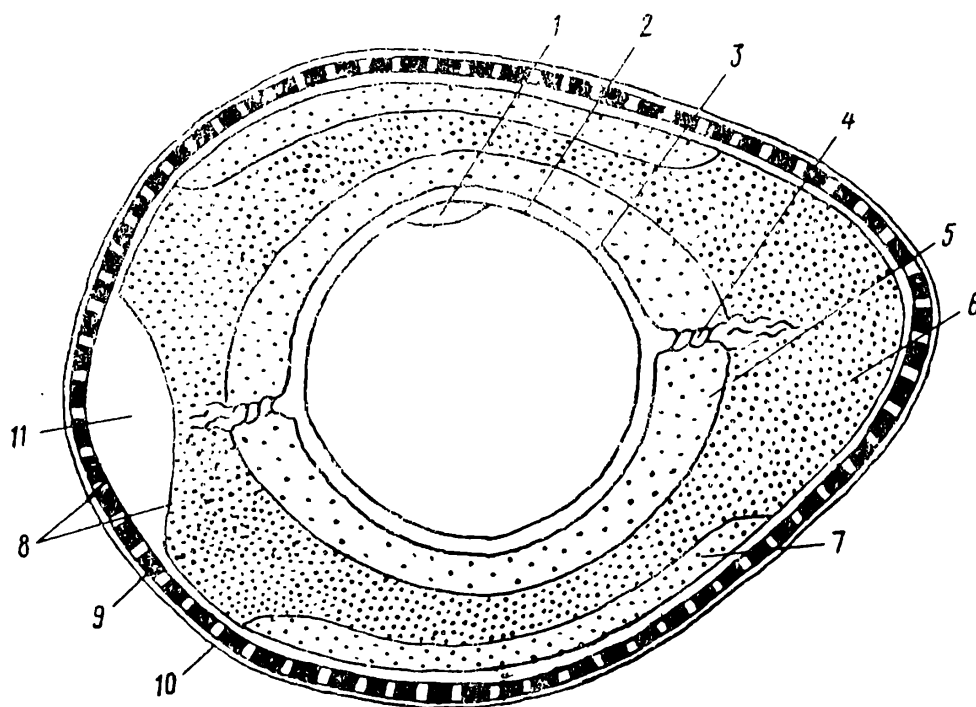


Рис. 15. Схема расположения яйцевых оболочек в отложенном яйце курицы (по: Рольник, 1968).

1 — зародышевый диск, 2 — желточная оболочка, 3 — халазиферный слой белка, 4 — халазы, 5 — внутренний слой жидкого белка, 6 — слой густого белка, 7 — наружный слой жидкого белка, 8 — подскорлуповые оболочки, 9 — скорлупа, пронизанная порами, 10 — кутикула, 11 — воздушная камера яйца.

Возникновение в ходе эволюции сложных яйцевых оболочек у Amniota было одним из условий, обеспечивших возможность их перехода к наземному развитию. У птиц яйцевые оболочки достигают большого совершенства. Они предохраняют зародыш от повреждений; создают в яйце определенный резерв влаги в некоторой степени служат источником питания. Белковая оболочка, обладающая мощными антибиотическими свойствами предохраняет эмбрион от инфекций, скорлуповая — от избыточного испарения, она же служит источником солей кальция для зародыша.

ГИДРОЗОИ

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БИОЛОГИИ ГИДРОЗОВ И ВЫБОР ОБЪЕКТОВ

Гидрозои характеризуются метазенезом — чередованием медузоидного и полипоидного поколений. В типичном случае гидроидные полипы размножаются только почкованием, что приводит к образованию колоний, в которых наряду с новыми полипами (гидрантами) формируются особи полового поколения — свободноплавающие медузы или недоразвитые прикрепленные медузоиды (гонофоры). Для изучения эмбрионального развития лучше использовать свободноплавающих медуз, которые выметывают яйца в воду, так что все стадии развития можно наблюдать прижизненно и на тотальных препаратах. При подавлении медузоидного поколения эмбриогенез протекает внутри гонофоров, и его изучать приходится по срезам.

В наших северных морях (Баренцево, Белое) наиболее доступны колонии *Obelia*, *Coryne*, *Clava*, а в планктоне часто встречаются медузы *Obelia*, *Rathkea* и *Bougainvillea*. Но для знакомства с развитием *Hydrozoa* можно использовать и другие объекты.*

Колонии гидроидных полипов собирают на литорали в период отлива, извлекая из воды вручную или с помощью «коши» (пучок металлических прутьев с загнутыми концами) водоросли и камни, которые служат для них субстратом. Кусочки колоний сразу же помещают в банки с морской водой, чтобы не дать им обсохнуть.

Гидроидных медуз добывают во время прилива при помощи планктонных сеток. В лаборатории медуз из планктонных сетей следует перенести пипеткой в сосуды с чистой водой.

Для определения материала рекомендуется пользоваться книгой Д. В. Наумова [1960].

Гидроидных полипов лучше всего содержать в стеклянных

* Общий очерк жизненных циклов гидрозоев дается в сводках Д. В. Наумова [1960], Кюна [Kühn, 1913] и Тардента [Tardent, 1978].

чашках (типа чашек Коха) в прохладном месте и периодически менять воду. При длительном культивировании эти чашки завязывают мельничным газом или марлей и помещают в аквариум с проточной водой.

Отловленных медуз содержат в аквариумах от 5 до 10 сут, за это время происходит откладка и оплодотворение яиц. Необходимым условием успешного содержания планктонных животных в аквариуме является температура воды, соответствующая естественной (9°C), и достаточно большой объем воды на одну особь. После откладки яиц медуз удаляют, а воду про фильтровывают через воронку с мельничным газом. Осадок с фильтра смывают в чашку Петри и под контролем биноклярной лупы отбирают яйца в микроаквариумы.

При 14°C развитие *Obelia loveni* от яйца до планулы продолжается в гонофоре 2 сут. Еще через 12—24 ч планулы прикрепляются и превращаются в полип — родоначальник колонии.

В качестве субстрата для оседания планул на дно чашки Петри можно положить пскровные стекла (лучше, если они предварительно покрываются слоем детрита). Прикрепившиеся на их поверхность планулы и формирующиеся из них полипчики впоследствии могут быть без отделения субстрата заключены в бальзам для изготовления тотальных препаратов.

Для изготовления препаратов полипов с вытянутыми щупальцами и гипостомами их предварительно анестезируют хлоралгидратом или сернокислой магнезией: насыщенный раствор анестетика в морской воде добавляют в сосуд с расплавленными полипами постепенно, спуская каплю по стенке сосуда. Фиксируют в той же посуде, приливая 40%-ный формалин, пока его концентрация в чашке не достигнет 4%. После получасовой фиксации и промывки в пресной воде объект переносят в 70%-ный спирт.

В качестве фиксаторов можно употреблять жидкость Буэри и смесь формалина (40%-ный), спирта (96%-ный) и ледяной уксусной кислоты в отношении 3:1:0,3. Последний имеет то преимущество, что при быстрой фиксации (5—10 мин) не требует длительной отмывки.

Медуз фиксируют, прибавляя в сосуд с небольшим количеством воды 40%-ный формалин.

При проводке колонии лучше переносить из одной среды другую пинцетом с тонкими кончиками, захватывая проксимальный конец стволика без зооидов, а отдельные полипы, гонангии, эмбрионы, планулы — пипеткой. Фиксацию и проводку делают в солонках, прикрытых сверху, во избежание испарения жидкостей, или, что лучше — в широкогорлых бюксах.

Колонии окрашивают в спиртовом или квасцовом кармин (2—3 мин), затем дифференцируют в подкисленном спирте (0,5 г конц. HCl на 100 г 70%-го спирта). Можно развести

приготовленный по прописи кармин в несколько раз (до 10 раз) и окрашивать несколько часов, в этом случае хорошо прокрашиваются ооциты в незрелых гонангиях *O. loveni*, а также ооциты, мигрирующие в энтодерме ценосарка. Скопления интерстициальных клеток (предшественников гоноцитов) и сами половые клетки хорошо красятся 0,1%-ным водным раствором толуидинового синего, окраску можно дифференцировать в 80—90%-ном спирте, при этом ярко синими оказываются ядрышки и цитоплазма, ядро остается светлым. Дифференцируют окраску под контролем микроскопа.

Обезвоживание производится в спиртах (70—96—100%-ный), затем объект переносится в ксилол. В каждом реактиве его содержат от 3 до 10 мин, в зависимости от размера. Медленнее следует вести полипы *Athysata*, быстрее — колонии *Thesaphora*. Перед заключением колонии в бальзам ее ветви и зооиды осторожно расправляют препаровальными иглами. Покровное стекло необходимо установить на «ножках» — между предметным и покровными стеклами в участки, свободные от объекта, поместить мелкие кусочки покровного стекла, бумаги или пластика. Для получения срезов обезвоженный в спиртах объект заливают через хлороформ и хлороформ-парафин в парафин. Срезы (5-6 мкм толщиной) окрашивают гистологическими красителями, чаще всего толуидиновым синим, четко выделяющим интерстициальные клетки, ооциты и эмбрионы.

2. ФОРМИРОВАНИЕ МЕДУЗОИДНЫХ ПОЧЕК

Медузоидные почки образуются как на ценосарке, так и на самих гидрантах. При этом гидрант может видоизмениться, утратив щупальца и другие анатомические структуры, служащие для захвата и переваривания пищи, и превратиться в гонозооид, или бластостиль. Бластостиль с формирующимися на нем медузами образует гонангий. У гипогенетических полипов медузоидное поколение в форме медузоидов, или гонофоров остается прикрепленным к полипу.

Последовательные стадии формирования типичной медузы на теле *Podocoryne carnea* представлены в виде схематических рисунков с продольных и поперечных срезов (рис. 16). Медузоидная почка закладывается в виде булавовидного выпячивания эпидермы и гастродермы (рис. 16, а). В дистальной части почки образуется плотное разрастание эпидермы — медузоидный узелок, или энтокодон, гастродерма образует под ним углубление (рис. 16, а, б, в). В медузоидном узелке появляется полость — зачаток полости субумбреллы будущей медузы (рис. 16, г), которая затем прорывается наружу, и почка приобретает форму колокола. Со дна колокола приподнимается небольшое выпячивание (спадикс), на вершине которого прорывается рот, таким образом формируется хоботок медузы (рис.

16, *e*). Центральная часть гастральной полости под хоботком превращается в желудок, а в периферических интеррадиальных частях стенки гастральной полости слипаются. Между двумя слоями гастродермы полость сохраняется лишь в форме четырех радиальных каналов и кольцевого канала, проходящего по

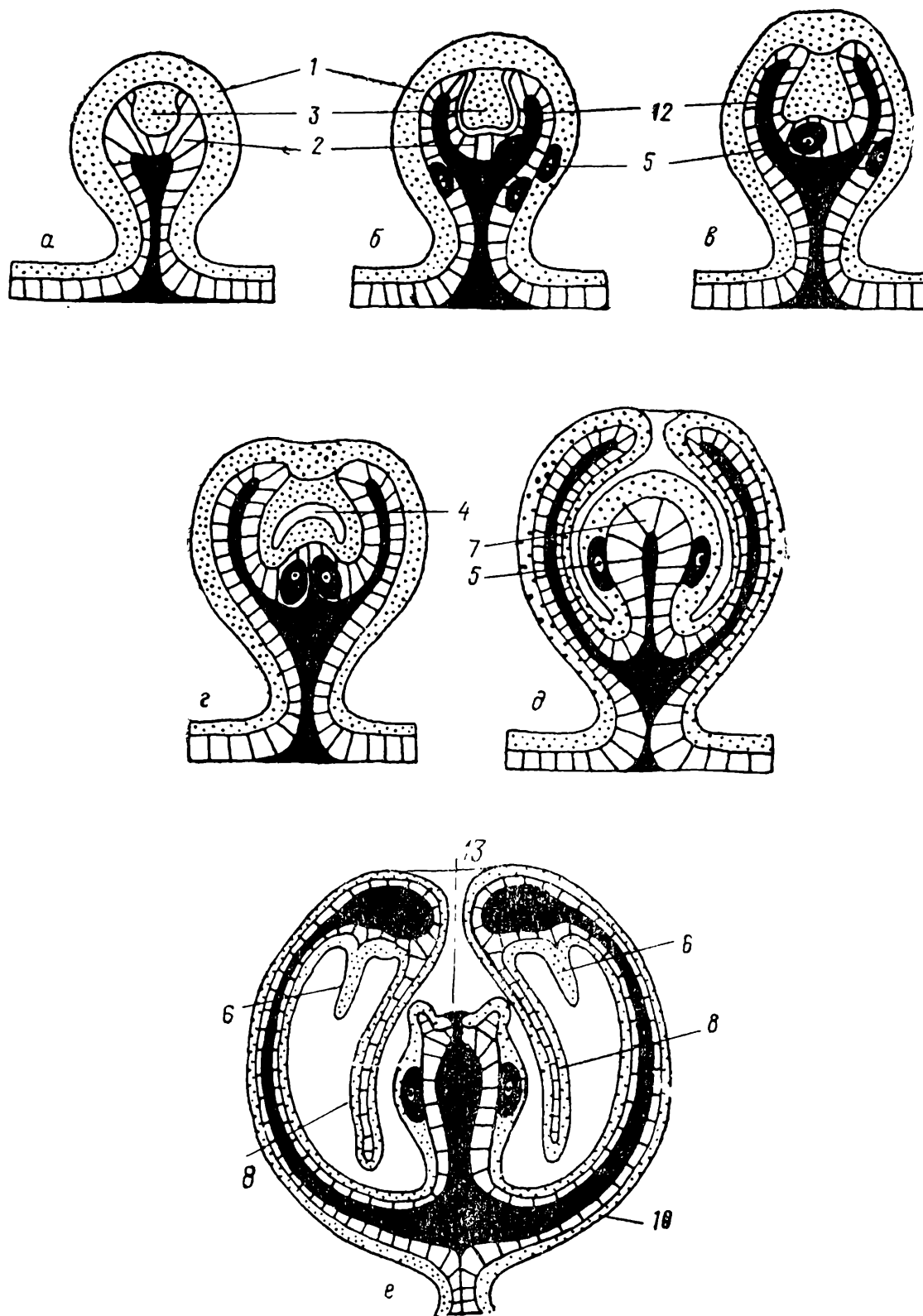


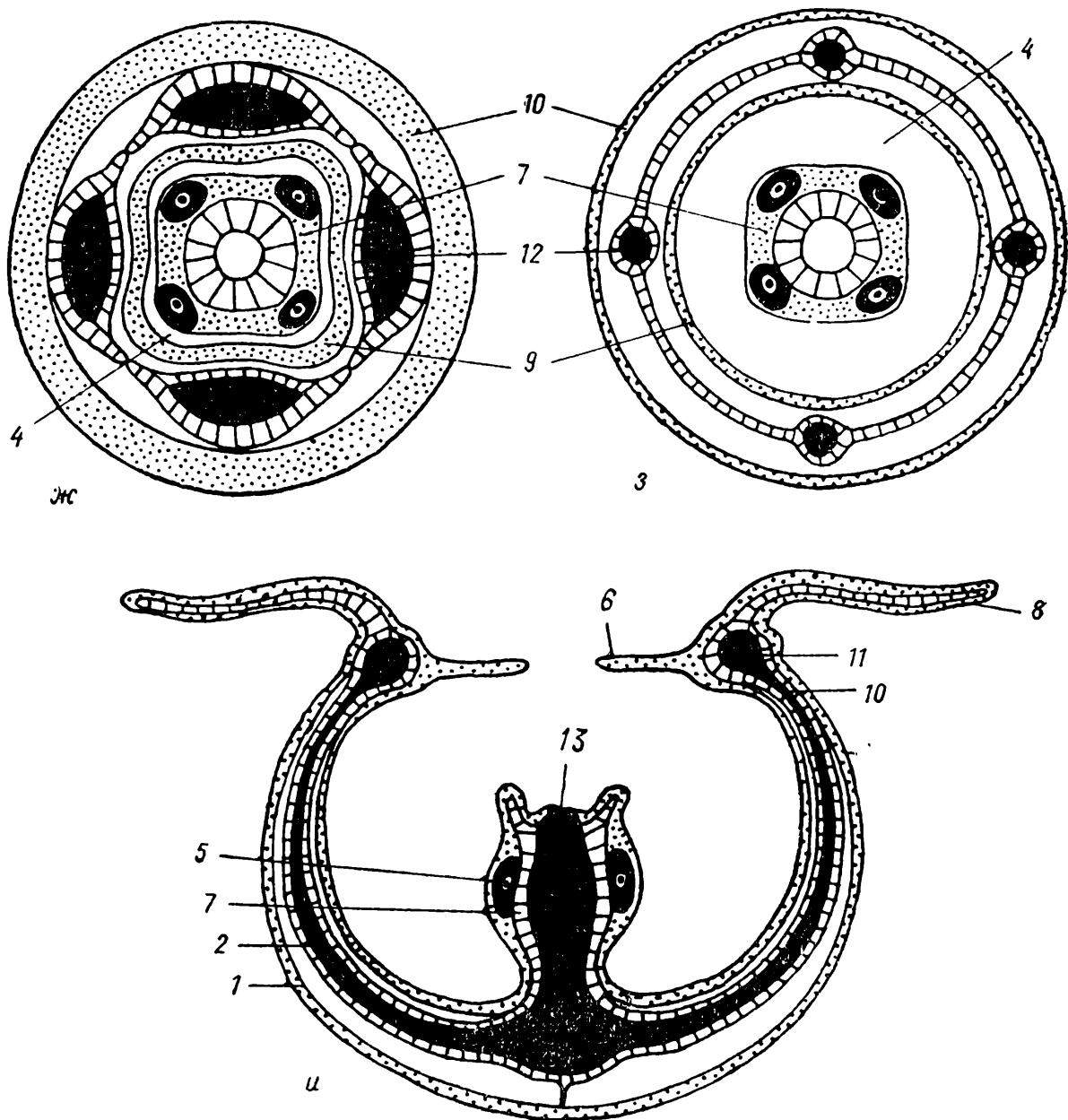
Рис. 16. Развитие медузы

a — e — схематическое изображение последовательных стадий развития (*a — e* — 2 — гастродерма, 3 — энтокодон, 4 — полость колокола, 5 — ооциты, 6 — парус, 7 — 12 — радиальный

краю колокола (рис. 16, ж, з). Между эпи- и гастродермой выделяется мезоглея, формируются щупальца и парус (рис. 16, е). Сформированная медуза (рис. 16, у) отделяется от полипа.

Во время формирования медузоидной почки в нее проникают первичные половые клетки (гоноциты), находящиеся на стадии роста. Гоноциты образуются из стволовых интерстициальных клеток в других частях колонии. Их иммиграция осуществляется благодаря амебоидной подвижности. Из скопления половых клеток на хоботке или по ходу радиальных каналов образуются гонады.

Количество яиц, продуцируемых свободноплавающими меду-



Podocoryne carnea [Fray, 1968].

продольные, ж, з — поперечные срезы), у — сформированная медуза; 1 — эпидерма, манубриум, 8 — щупальца, 9 — субумбрелла, 10 — эксумбрелла, 11 — кольцевой канал, 13 — рот.

зами, довольно велико, а в медузоидах гипогенетических полипов созревает только 4—6 яиц.

С формированием медузоидных почек можно познакомиться на примерах *Coryne tubulosa* и *C. loveni*, *Clava multicornis* и *Obelia loveni* (прижизненно и по тотальным препаратам).

Медузоидные почки *Coryne tubulosa* и *C. loveni*. Полипоидное поколение *Coryne* образует небольшие колонии высотой 10—20 мм. От гидроризы отходят вертикальные стволы гидрокаулюса. Они либо заканчиваются терминально сидящими гидрантами, либо образуют небольшое количество боковых веточек. *C. loveni* имеет более высокие и кустистые колонии, чем *C. tubulosa*. Гидрориза и стволы колонии одеты хорошо выраженным перисарком, он в виде нежной пленки заходит и на базальную часть полипов. Рот полипа помещается на конце конусовидного гипестома, щупальца располагаются довольно беспорядочно в средней части полипа (рис. 17, а, б).

У *C. tubulosa* в базальной части тела полипа формируются 1—2 типичные медузы. Размер зонтика отделившейся медузки 1,5—2 мм (рис. 17, в). Основные анатомические детали, возникающие и изменяющиеся в ходе развития медузы, можно проследить на живом материале при помощи бинокулярной лупы, а продольные и поперечные гистологические срезы дадут более глубокое представление о процессе, идущем по схеме, приведенной для *Podocoryne carnea* (см. рис. 16). На рис. 17, б с тотального препарата представлена почка медузы, в которой различается зачаток хоботка (спадикс), окруженный складкой — зачатком стенки колокола.

У *Coryne loveni* (рис. 17, а) также на теле полипа, под нижними щупальцами развиваются 2—3 медузоидных почки, однако они не отделяются, достигая лишь стадии прикрепленного медузоида. Последний имеет 4 радиальных канала и кольцевой канал, зачатки щупальцевых бульб (без глазков) и сильно развитый ротовой хоботок, занимающий все пространство субумбреллярной полости; он может несколько выдаваться наружу и сокращаться. Сквозь колокол просвечивают красноватые гонады. У этого вида наблюдается особый способ бесполого размножения — фрустуляция, при которой дистальные концы некоторых боковых веточек колонии утолщаются (рис. 17, а) и постепенно отделяются в виде продолговатых телец — фрустул длиной в несколько миллиметров. Фрустулы могут передвигаться по субстрату (дну чашки Петри); через 2—3 сут они приклеиваются и превращаются, как и планулы, в первый полип — основатель колонии. На колониях можно одновременно встретить и медузоиды, и фрустулы. При осторожном изготовлении тотальных препаратов они не отрываются (фрустулы остаются длительное время связанными с колонией общим перисарком). Если фрустулы поместить на покровном стекле на дно чашки, можно затем, не отделяя их от «субстрата», сделать

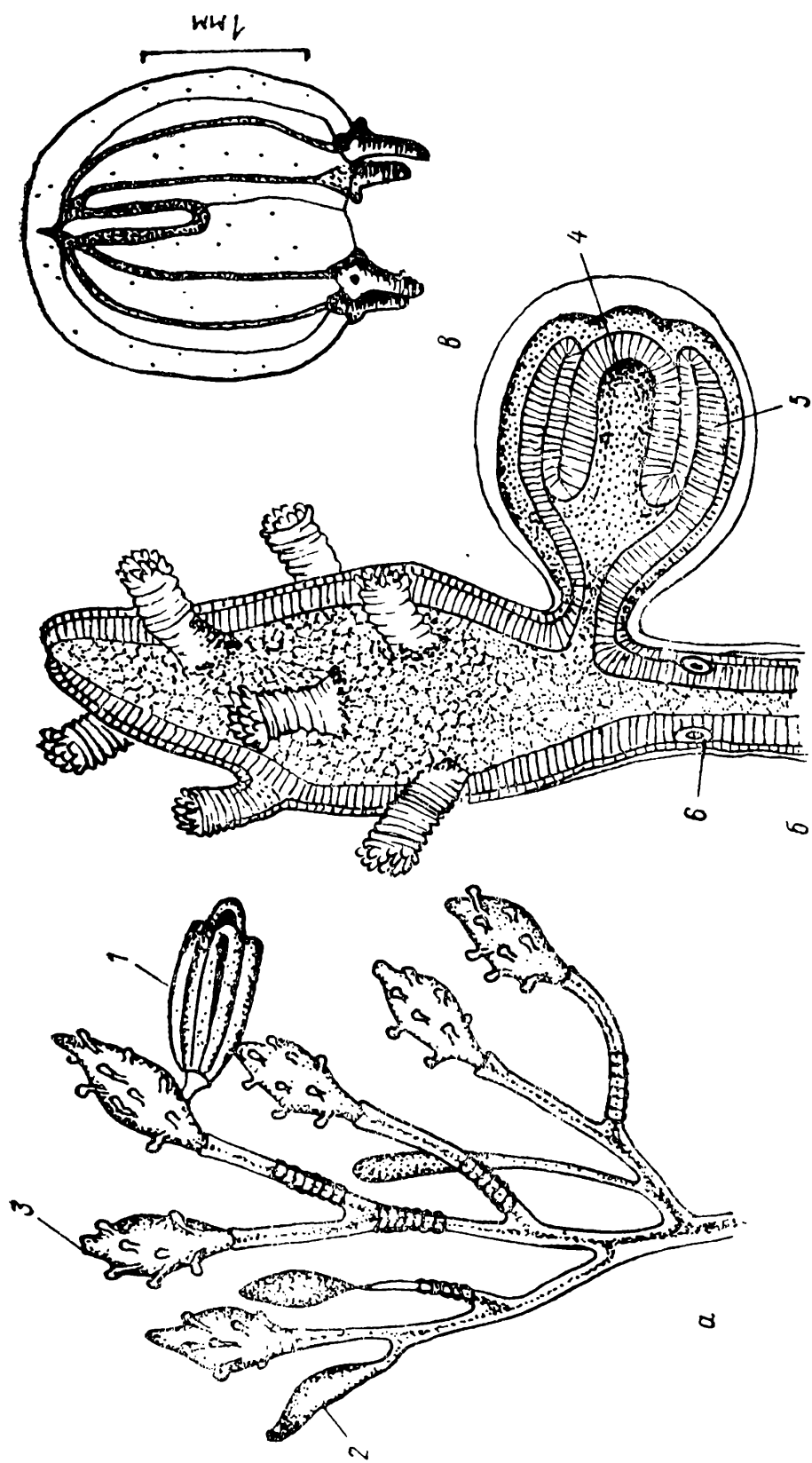


Рис. 17. Формирование медузы у *Coryne tubulosa* и *Coryne loveni*.
 а — часть колонии *C. loveni*, б — гидрант с медузоидной почкой, в — общий вид медузы [Наумов, 1960] с сокращенными щупальцами; 1 — медузоид, 2 — фрустула, 3 — рот, 4 — спадиокс, 5 — зачаток стенки колокола, 6 — ооцит.

препараты разных стадий превращения их в полипчики. На Баренцевом море (в районе Дальних Зеленцов) фрустуляция наблюдается в конце июля и связана, очевидно, с изменением физиологического состояния колонии — деградацией ее надземных частей.

Гонангий *Obelia loveni*. Род *Obelia* включает ряд видов, характеризующихся разной степенью редукции медузоидного поколения. У *O. geniculata* и *O. longissima* формируются типичные свободные медузы. У *O. flexuosa*, *O. loveni*, *O. angulata* образуются прикрепленные гонофоры, в которых созревают половые клетки и протекает эмбриональное развитие.

В состав больших древовидных симподиально ветвящихся колоний *Obelia* входят многочисленные зооиды. Ветви гидрокаулюса одеты перисарком, образующим гидротеку, внутри которой помещается гидрант, его дистальные части в расправлен-

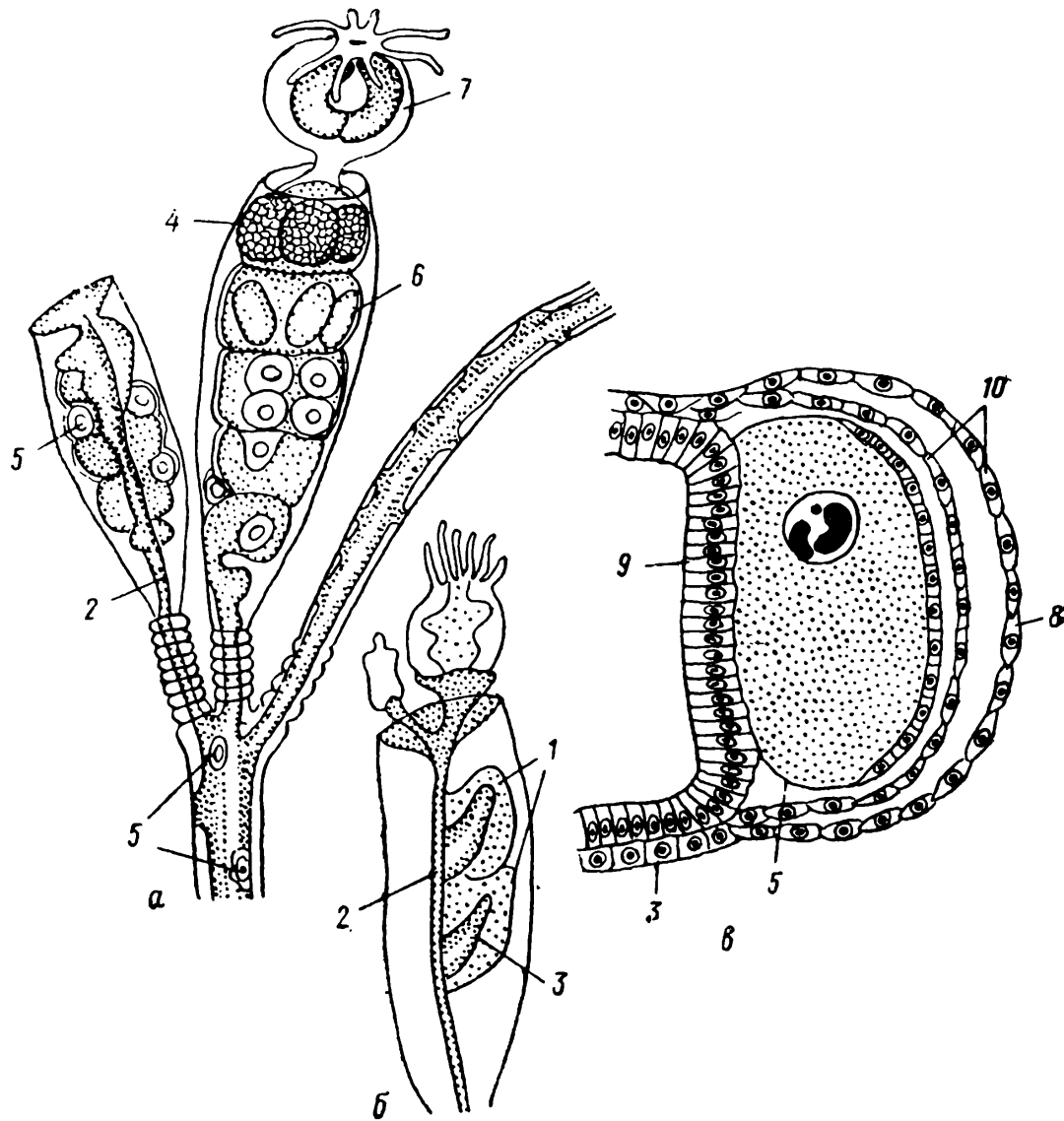


Рис. 18. Женские (а) и мужские (б) гонангии *Obelia loveni* с гонофорами:
 в — срез через участок гонофора с ооцитом (ув. 10×40); 1 — гонофоры, 2 — blastostyle, 3 — спадикс, 4 — эмбрионы, 5 — ооциты, 6 — яйца, 7 — планулы в меконидии, 8 — эпидерма, 9 — гастродерма, 10 — расслоившийся зиготодон.

ном состоянии выдаются из гидротеки. Гастроваскулярные полости всех зооидов колонии сообщаются. Медузоидные почки формируются на бластостильях. Каждый бластостиль с медузоидными почками прикрыт гонотекой и образует гонангий (рис. 18). Бластостиль лишен ротового отверстия и щупалец, его дистальный конец образует крышечку. У основания бластостилья располагаются самые молодые почки, у дистального конца — готовые к отделению молодые медузы или гонофоры с эмбрионами на поздних стадиях развития.

На рис. 18, а, б представлены женский и мужской гонангии *O. loveni*. Все гонодфоры отпочковываются на одной стороне бластостилья. Женские гонофоры в своем развитии приобретают зачаток энтокодона, между ним и гастродермой собираются мигрирующие ооциты. На срезе через гонофор (рис. 18, в) можно видеть очень крупный ооцит, который лежит в углублении на гастродерме спадикса; снаружи он одет несколькими слоями плоских эпидермальных клеток. Эти слои настолько тонки и прозрачны, что при внешнем осмотре гонангия белые овальные ооциты, хорошо различимые и невооруженным глазом, кажутся лежащими свободно на поверхности спадикса. В каждом гонофоре находятся 4 яйца, по мере развития которых, спадикс постепенно редуцируется, эмбрионы теряют с ним связь. Мужской гонофор устроен проще: энтокодон в нем не образуется. Зрелые гонофоры, которые на удлинившемся бластостиле выносятся из гонангия, называются меконидиями. Мужской меконидий представляет собой капсулу со спермиями, на ее верхушке имеется небольшое отверстие, окруженное несколькими короткими щупальцами, через которое спермии рассеиваются в окружающей колонию среде. Из женских меконидиев, также снабженных щупальцами, выходят планулы.

Гонофор *Clava multicornis*. Колонии *C. multicornis* чаще всего поселяются на фукусах и представлены стелющейся гидроризой, на которой на коротких ножках довольно плотно сидят отдельные гидранты. Перисарк выражен очень слабо, на гидрантов он не заходит. Сами полипы имеют веретеновидную форму, в их средней части более или менее беспорядочно располагаются щупальца. На оральном конце конического гипостома находится рот. Сразу же под нижними щупальцами располагаются многочисленные почти шаровидные гонофоры (рис. 19, а). Колонии раздельнополые; в женских гонофорах просвечивают яйца. Гонофоры одного и того же полипа находятся на разных стадиях развития. Детали формирования гонофора, иммиграцию ооцитов в почку гонофора лучше изучать на продольных срезах через полип, на уровне формирования гонофоров. Почка гонофора закладывается как выпячивание стенки тела полипа. В результате размножения клеток апикальной эпидермы образуется плотное разрастание — энтокодон (рис. 19, в). На следующей стадии (рис. 19, г) в энтокодоне разли-

чается небольшая полость — зачаток полости субумбреллы. Этим ограничиваются признаки медузы в гонофоре *Clava*. На рис. 19, *д* изображен гонофор с крупным ооцитом, который отделен от окружающей среды несколькими слоями клеток.

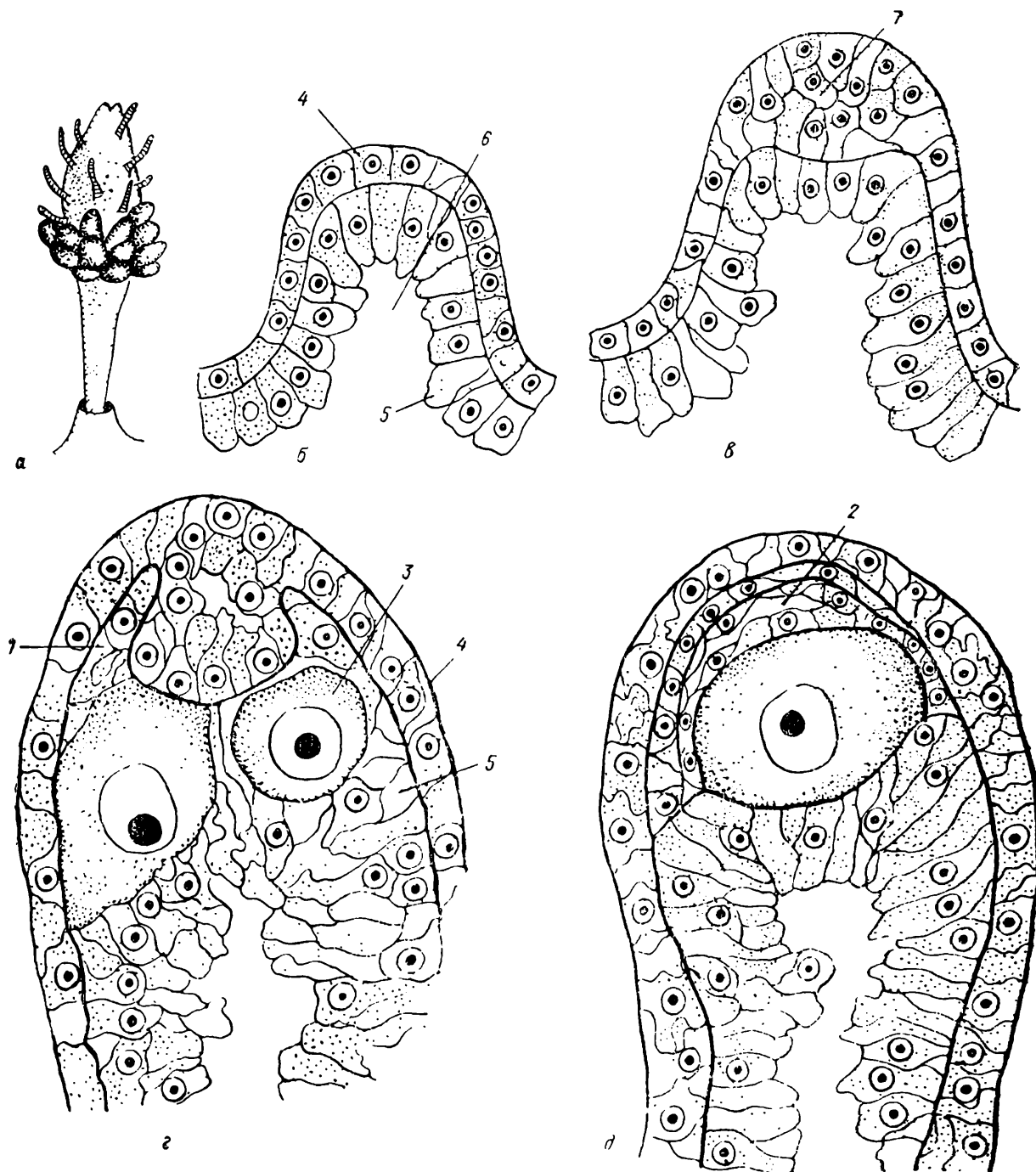


Рис. 19. Формирование гонофора *Clava multicornis*.

а — полип с гонофорами, *б-д* — последовательные стадии формирования гонофора (ув. 10×40); 1 — зачаток зонтика, 2 — зачаток субумбреллы, 3 — ооцит, 4 — эпидерма, 5 — гастродерма, 6 — гастроваскулярная полость, 7 — энтокодон.

3. ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

Оплодотворение и развитие метагенетических гидроидов происходит в воде, реже — на хоботке материнской медузы, у гипогенетических полипов — в медузоидах или гонофорах.

Зрелые яйца лишены яйцевых оболочек и относятся к изодиплительному типу. У видов с типичным метагенезом яйца содержат мало желтка, который располагается в эндоплазме; периферическая цитоплазма, эктоплазма почти не содержит желтка. В яйцах, развивающихся в гонангиях и гонофорах, количество желтка увеличивается. Полярность яйца определяется только положением ядра, которое смещено к анимальному полюсу, где при делениях созревания выделяются полярные тельца.

При оплодотворении яиц в гонангиях спермии, привлеченные специальными веществами — аттрактантами, проходят через ткани крышечки.

Формам, у которых развитие яиц происходит в воде, свойственно полное равномерное дробление. Если желтка в ооплазме много, дробление может быть неравномерным. Своеобразной особенностью дробления гидрозоев является относительная неустойчивость, изменчивость расположения бластомеров и врезающийся характер первых борозд дробления. При типичном метагенезе в результате дробления образуется целобластула, плавающая с помощью жгутиков, у такой личинки энтодерма чаще всего образуется путем униполярной иммиграции. При дроблении яиц гипогенетических видов наблюдаются тангентальные (параллельные поверхности яйца) деления, в результате образуется плотный клеточный зародыш — морула, а гастрюляция происходит по типу морульной деляминации, вследствие чего формируется паренхимула. Она представляет собой зародыш, несколько удлиненный по анимально-вегетативной оси с эпителизированной эктодермой и энтодермой в виде аморфной клеточной массы в центре зародыша. Бластомероподобные клетки энтодермы долго сохраняют желточные включения, в то время как в эктодермальных намечаются признаки дифференциации: закладываются жгутики, появляются секреторные гранулы на вегетативном полюсе. Эктодерма и энтодерма разделяются мезоглеей. Паренхимула преобразуется в планулу, которая выплывает из меконидия и переходит к свободному образу жизни.

Полагают, что взаимодействие плазматической мембраны спермиев с клетками гонангия обуславливает биохимические изменения, подобные капацитации спермиев высших животных: спермии приобретают способность взаимодействовать с яйцеклеткой. Отчасти этим объясняются неудачи при попытках осуществить искусственное оплодотворение яиц, извлеченных из гонангия.

Развитие *Rathkea fasciata* прекрасно описано Мечниковым в 1886 г., развитие *R. octopunctata* изучал Дондуа [1952], он же наблюдал прикрепление планулы, формирование миниатюрного полипа и образование на нем зачатка медузы. Развитие *Rathkea* представляет интерес в связи с имеющимся у нее

своеобразным способом бесполого размножения: на хоботке отпочковываются дочерние медузки, которые отделяются и переходят к свободному образу жизни (рис. 20, а).

Развитие этой гидромедузы можно наблюдать в лабораторных условиях. Из яиц, отложенных вечером, к утру образуются бластулы.

Зрелое яйцо бесцветное, прозрачное (рис. 20, б), имеет правильную шарообразную форму, небольшие размеры (около 100 мкм). Удельный вес яиц больше удельного веса воды, поэтому они опускаются на дно. Яйцевых оболочек нет. Яйца *Rathkea* (как и у других *Hydrozoa*) относятся к изолецитальному типу. Желтка мало, в цитоплазме различается внутренняя эндоплазма и периферическая эктоплазма, последняя в виде тонкого прозрачного ободка. Ядро ооцита, круглое или овальное, располагается ближе к анимальному полюсу. Полярные тельца у *Rathkea*, несмотря на отсутствие желточной оболочки, сохраняются и во время дробления, удерживаемые гликопротеиновым слоем, окружающим яйцо. Они дополнительно маркируют анимальный полюс.

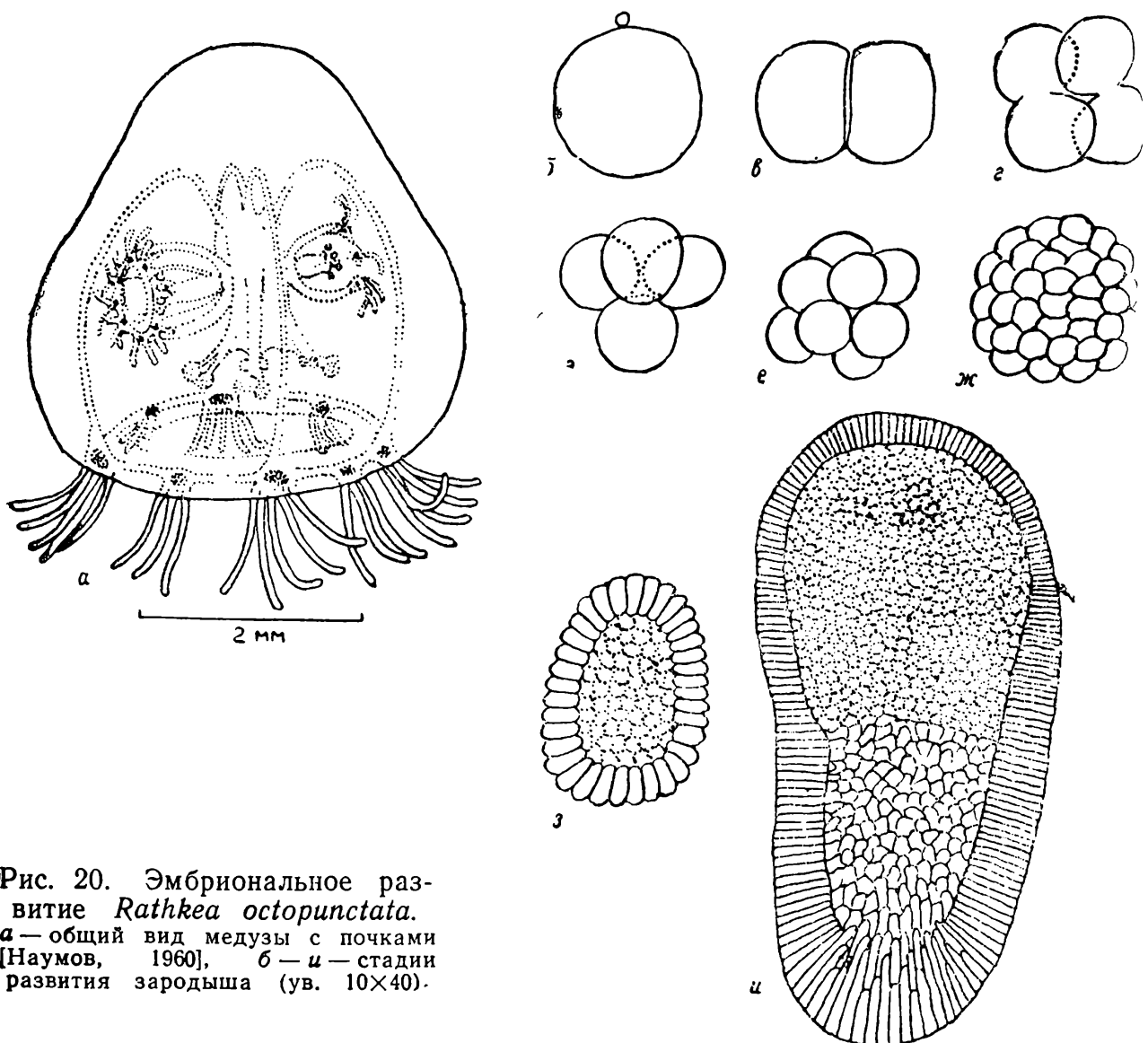


Рис. 20. Эмбриональное развитие *Rathkea octopunctata*. а — общий вид медузы с почками [Наумов, 1960], б — и — стадии развития зародыша (ув. 10×40).

После оплодотворения ядро остается у периферии яйца, через 1—1,5 ч на анимальном полюсе появляется врезывающаяся борозда, она постепенно углубляется в толщу яйца, пока не азорвется перемычка, соединяющая бластомеры в нижней части. На стадии, представленной рис. 20, в, бластомеры уже азъединены. Вторая борозда проходит также меридионально (рис. 20, г), перпендикулярно первой и, появляясь на внутренней поверхности соприкасающихся бластомеров, распространяется полукругом центробежно. Каждая пара еще не вполне разделившихся бластомеров смещается относительно другой так, что получившиеся 4 бластомера располагаются в форме тетраэдра — двумя перекрывающимися дуэтами (рис. 20, д). Восемиклеточный зародыш (рис. 20, е) состоит из двух кварталов, крестообразно лежащих друг над другом; они образуются в результате прохождения третьей борозды и последующего смещения бластомеров на 45°. На стадии бластулы (рис. 20, ж) клетки приобретают жгутики, зародыш превращается в овальную личинку, которая плавает расширенным концом вперед. Энтодерма образуется путем униполярной иммиграции (рис. 20, з), что приводит к появлению паренхимы. Выселение клеток по современным данным происходит у Hydrozoa на анимальном полюсе.

Стадии эмбрионального развития *Obelia loveni* (срезы через гонифору). На серии продольных срезов через гонифору *O. loveni* (или *O. flexuosa*) можно обнаружить эмбрионы на разных стадиях развития начиная с ооцитов в нижних почках гонифор и кончая планулами, готовящимися покинуть колоний.

В каждой гонифоре, как правило, развивается по 4 яйца, и на одном срезе все они одновременно видны не бывают (рис. 21, а). Поздние ооциты и яйца не имеют правильной округлой формы, так как слишком плотно прижаты друг к другу внутри гонифоры. Желток равномерно распределен в виде гранул по всему объему яйца. Ооциты имеют крупное пузыревидное ядро с дольчатым или четковидным ядрышком. Ядро расположено в центральной части ооцита, но в конце периода роста, перед делениями созревания, оно смещается на сторону, противоположную месту контакта ооцита с энтодермой бластостигмы.

На срезе, изображенном на рис. 21, б, можно видеть начало первого деления дробления. Врезывающаяся борозда начинается на анимальном полюсе яйца, который маркирован полярными клетками (локализация полярных телец, однако, не постоянна, они могут смещаться по свободной поверхности лишнего оболочек яйца). На рис. 21, в изображен срез через яйцо на стадии второго деления. Хорошо видно, что врезывающиеся борозды образуются на внутренней поверхности первых двух бластомеров. Рис. 21, г представляет срез, прошедший через два зародыша на стадии 4 бластомеров. В каждом зародыше видны

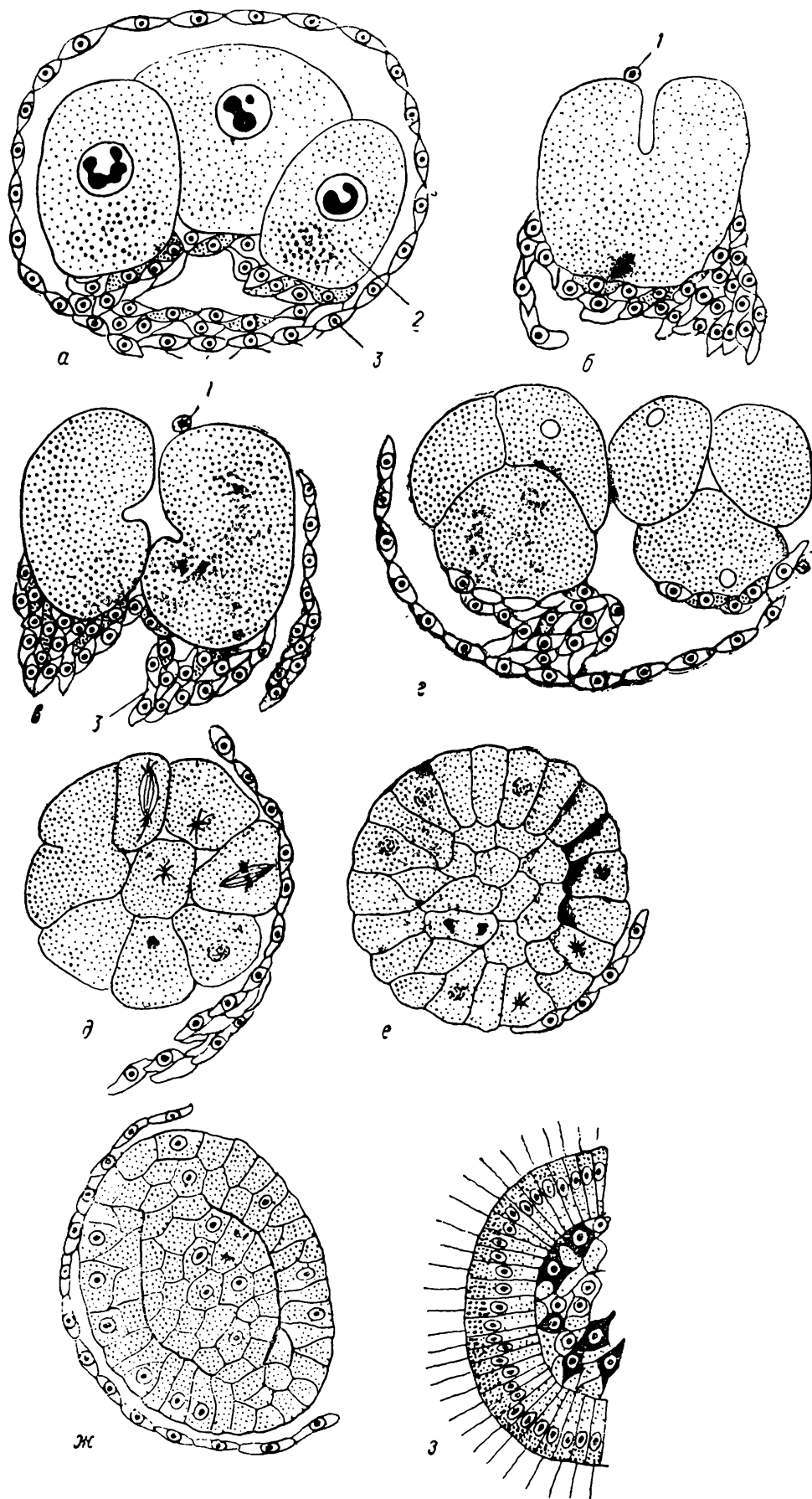


Рис. 21. Эмбриональное развитие *Obelia loveni*. Ув. 15×40.

— з — последовательные стадии развития зародыша; 1 — полярное тельце, 2 — ооцит
3 — ткань спадикса.

2 анимальных бластомера и один вегетативный, что следует из тетраэдрического расположения бластомеров: анимальные бластомеры, смещаясь относительно вегетативных, укладываются над промежутками между ними. Вегетативные бластомеры, прилегающие к ткани спадикса, не изменяют своего положения. На стадии приблизительно 8 и 16 клеток зародыш (рис. 21, д) представляет собой группу компактно лежащих бластомеров. Дробление еще остается равномерным и синхронным, о чем свидетельствует наличие митотических фигур во всех бластомерах. Некоторые бластомеры начинают делиться в тангентальном направлении, об этом можно судить по расположению оси митотического веретена. На стадии морулы (рис. 21, е) упаковка клеток становится все более компактной, они приобретают полигональную форму; их расположение свидетельствует о начале морульной деляминации. На стадии паренхимулы (рис. 21, ж) между экто- и энтодермой появляется резкая граница.

На поверхности паренхимулы организуется эктодерма — эпителиеподобный слой клеток, на апикальной поверхности которых формируются реснички. Базальные концы эктодермальных клеток подстилаются тонкой мезоглеальной прослойкой, отделяющей эктодерму от внутренней массы энтодермальных клеток. На рис. 21, з изображена часть стенки поздней паренхимулы. В энтодерме наблюдается дифференциация клеток: среди бластомероподобных клеток располагаются клетки с яркой базофильной цитоплазмой — это крупные i-клетки и книдобласты. Паренхимулы уже свободно лежат в гонофорах, вынесенных на удлинившемся бластостиле из гонангия (в меконидиях). В ходе дальнейшего развития паренхимула превращается в планулу.

4. ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

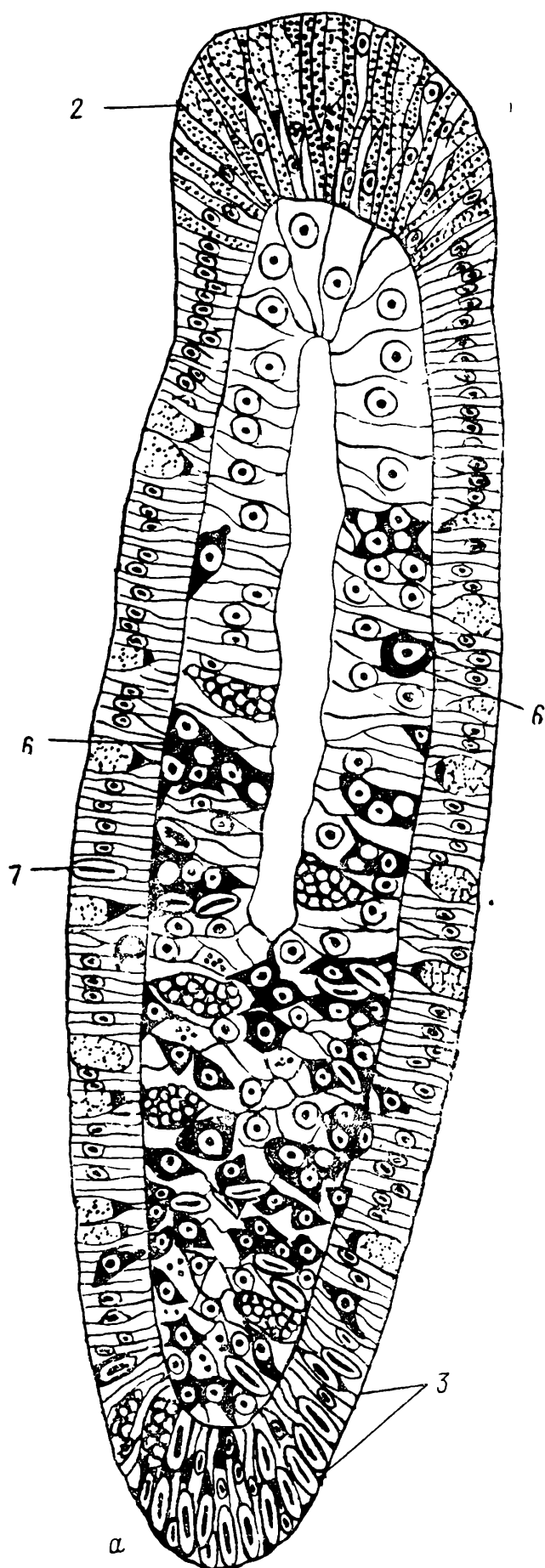
Гидрозои имеют в своем онтогенезе стадию личинки, выполняющей расселительную функцию. У метагенетических гидроидов активное плавание начинается на стадии бластулы. У гипогенетических форм большая часть развития протекает внутри гонофоров, вследствие чего плавающей личинкой становится только планула. Переход от паренхимулы к плануле выражается в том, что энтодермальные клетки принимают эпителиальное расположение и внутри образуется полость — гастрощель. Темп клеточных делений замедляется, и начинается дифференциация клеток: на заднем (суженном) конце в эктодерме появляются первые стрекательные капсулы. Эктодермальные клетки приобретают мионемы и превращаются в слой эпителиально-мышечных клеток — эпидерму. Дифференцируются нервные, чувствительные и железистые клетки. Планула не только плавает с помощью ресничек, но также производит сильные со-

кращения всего тела, укорачиваясь по продольной оси или изгибаясь. Личинка движется расширенным концом вперед, задний (суженный) соответствует тому полюсу зародыша, где началась гастрюляция.

У гипогенетических полипов сформированные планулы могут длительное время находиться в меконидии (до 1—2 сут), но стоит им выйти на свободу, как спустя несколько часов они прикрепляются и начинают преобразовываться в полип. У зародышей гипогенетических полипов дифференциация клеток начинается значительно раньше, чем у метегенетических.

На продольном срезе через планулу *O. loveni* видна ее отчетливая морфологическая полярность: на узком (заднем) конце личинки находится книдогенная зона, здесь книдобласты мигрируют из энтодермы в эктодерму, где в огромном количестве также формируются из i-клеток (рис. 22, а), на переднем расширенном конце планулы в эктодерме дифференцируется диск высоких секреторных клеток, их липкий секрет обуславливает прикрепление планулы к субстрату.

Превращение планулы *O. loveni* в полип начинается с прикрепления



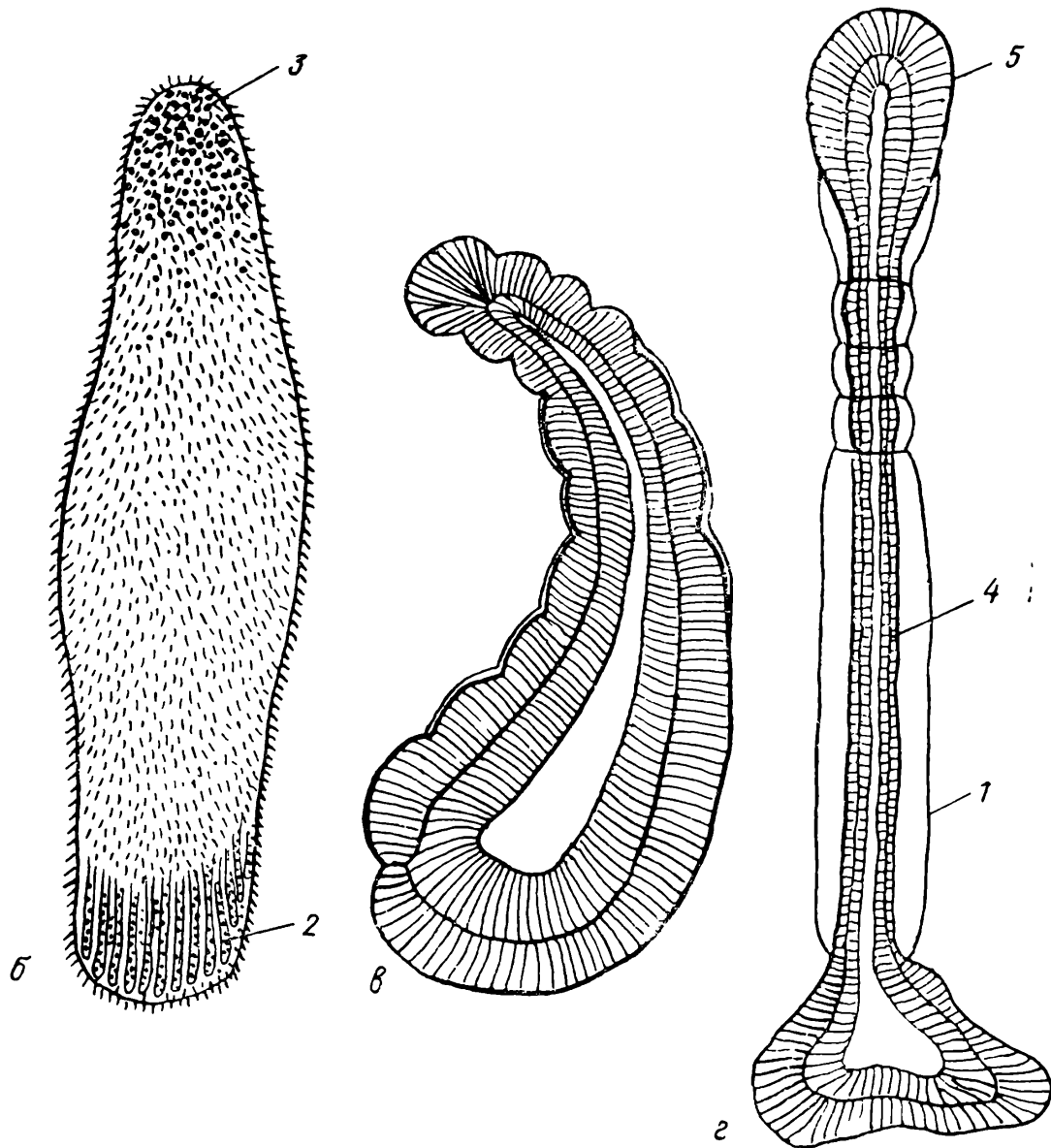


Рис. 22. Планула *Obelia loveni* и превращение ее в полип.

а — продольный срез (Ув. 15×40); *б* — общий вид, *в*, *г* — стадии метаморфоза; 1 — перисарк, 2 — скопление железистых клеток на базальном конце планулы; 3 — книдогенная зона на апикальном конце, 4 — гидрокаулюс, 5 — зачаток гидранта, 6 — *i*-клетки, 7 — книдоциты.

ее к субстрату передним концом (22, б). У такой личинки (рис. 22, в) ресничный покров исчезает, базальная часть расширяется. На суженном апикальном конце начинаются морфогенетические процессы, приводящие к преобразованию планулы в полип: изменяется ориентировка эпидермальных клеток, они образуют concentрические перетяжки, опоясывающие задний конец планулы, и начинают секретировать вещество перисарка. На следующей стадии (рис. 22, г) базальная часть личинки превращается в диск, который даст гидроризу, средняя — вытягивается в стебелек (гидрокаулюс), а ткани верхушки, где обильны стрекательные клетки, образуют булаво-

видное вздутие — зачаток первого полипа — гидранта. Перисарк под ним образует 4 кольцевых перетяжки.

Формирование гидранта показано на схеме (рис. 23). Верхушка концевое вздутия уплощается и образует концевую пластинку (рис. 23, а), по краю которой закладываются бугорки щупалец (рис. 23, б), а в середине приподнимается гипостом, в центре которого прорывается рот (рис. 23, в).

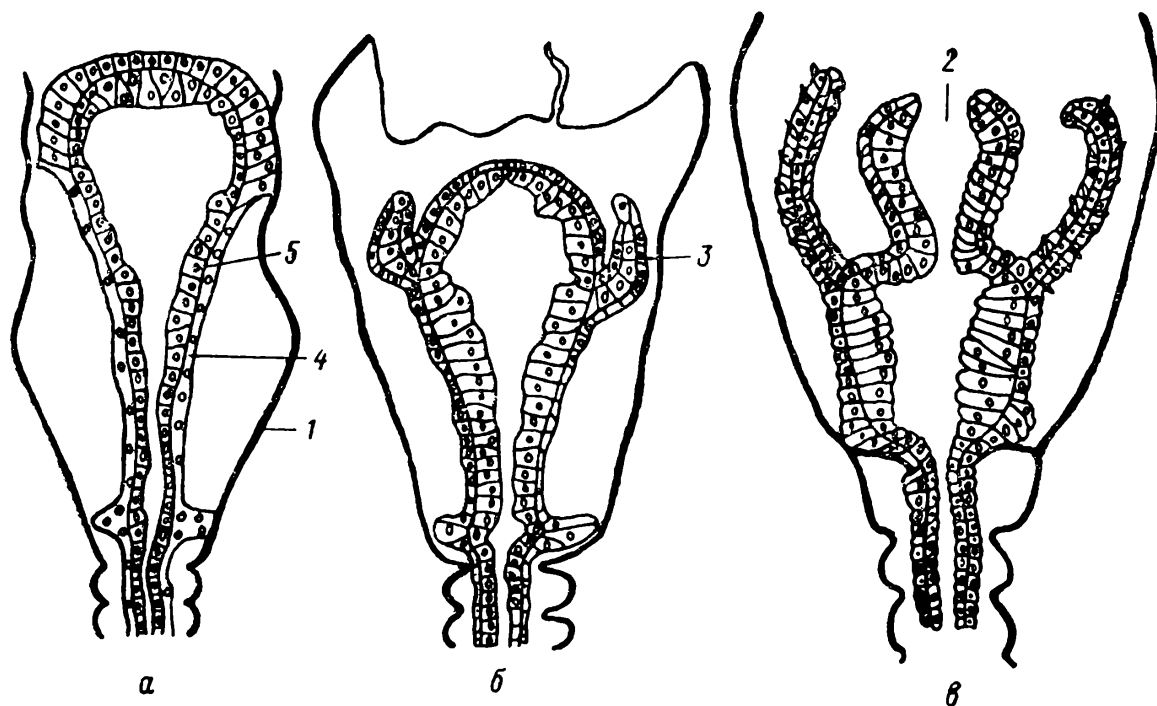


Рис. 23. Формирование гидранта [Kuhn, 1913].

а — концевое вздутие, б, в — образование хоботка (б) и ротового отверстия (в); 1 — перисарк (гидротека), 2 — рот, 3 — щупальце, 4 — эпидерма, 5 — гастродерма.

Проксимальная часть гидранта-родоначальника колонии *Obelia* дает начало стелющемуся по субстрату столону — гидроризе и вертикально растущему побегу, который образуется за счет последовательного отпочковывания гидрантов. Сложную колонию *Obelia* характеризует правильная, закономерная организация ее отделов. От центра — первичного гидранта — отходят лучи, представляющие собой участок гидроризы с вертикальными несущими гидранты побегами. Таким образом, по мере удаления от центра колонии возраст и размеры побегов уменьшаются. Гидрориза ветвится: от луча I порядка отходят лучи II порядка, затем III и т. д. Переплетающиеся на субстрате участки гидроризы одной колонии могут срастаться, маскируя эту правильную организацию. С наступлением периода размножения квидогенез, активно идущий в системе стволовых интерстициальных клеток ценосарка, дополняется гаметогенезом, на вертикальных побегах закладываются и формируются

гонангии. После того, как половое размножение закончится и планулы покинут медузоиды, начинается резорбция вертикальных побегов. У беломорских *O. loveni*, *O. flexuosa* и *O. geniculata* с ноября по март колония представлена только гидроризой (у *O. longissima* вертикальные побеги сохраняются и зимой). В период подготовки к зиме в гидроризе утолщается перисарк в результате активизации секреторной функции эпителиально-мышечных и специальных морулярных секреторных клеток эпидермиса, а в гастродермальных эпителиально-мышечных клетках накапливаются запасные питательные вещества. Клеточный состав зимующей гидроризы по сравнению с ценосарком (вертикальными побегами и гидроризой) летних колоний резко изменен: он представлен только эпителиально-мышечными клетками и немногочисленными большими *i*-клетками — родоначальницами. Весной, когда начнется формирование вертикальных побегов и рост дистальных концов гидроризы, эти стволовые *i*-клетки дадут все разнообразие специализированных клеточных типов — стрекательные клетки, нейроны, зимогенные секреторные клетки, гаметы и др.

КРУГЛЫЕ ЧЕРВИ

Классическим примером эмбриогенеза нематод издавна служит развитие лошадиной аскариды (*Parascaris equorum* = *Ascaris megalocephala*). Несмотря на то, что развитие более примитивных свободноживущих нематод отличается рядом особенностей,* лошадиная аскарида все же остается наиболее изученной в эмбриологическом отношении и может быть рекомендована как основной объект практикума. Кроме того, можно использовать более доступную свиную аскариду (*Ascaris suum*), развитие которой протекает сходно. Она обитает в тонком отделе кишечника свиней и может быть добыта на бойне (мясокомбинат). Яйца аскарид очень жизнестойки, поэтому их культивирование для наблюдения за эмбриогенезом, а также фиксацию половой системы для изучения гаметогенеза и оплодотворения можно начинать и через несколько часов после получения червей.

Аскарида — раздельнополое животное. Самка немного крупнее самца, который отличается загнутым на брюшную сторону задним концом тела. Для вскрытия самку помещают в небольшую кювету, дно которой залито парафином. Вскрытие обязательно производят под слоем воды или физиологического раствора (0,85% NaCl), чтобы избежать разбрызгивания полостной жидкости, раздражающей слизистые оболочки носа и глаз. Вскрывают самку аскариды со спинной стороны. На брюшной стороне находятся анальное и половое отверстия. Первое — в виде поперечной щели располагается в задней трети тела, второе, окруженное эпидермальным валиком, — в передней трети тела. Половые железы аскариды имеют форму сильно извитых трубочек, оплетающих кишку. Двумя препаративными

* Развитие свободноживущих нематод подробно описано О. М. Ивановой-Казас [1975].

иглами осторожно распутывают петли половой системы и складывают их на дне кюветы. Женские половые железы аскариды парные и имеют три слабо разграниченных отдела: яичник, яйцевод и матка. Обе матки впадают в короткое влагалище, которое открывается на брюшной стороне тела половым отверстием. Матки тянутся от влагалища к заднему концу тела, затем поворачивают и приблизительно на уровне середины тела червя переходят в более тонкие и извитые яйцеводы, которые, в свою очередь, превращаются в еще более тонкие яичники. Длина яичников почти в два раза превышает длину тела животного.

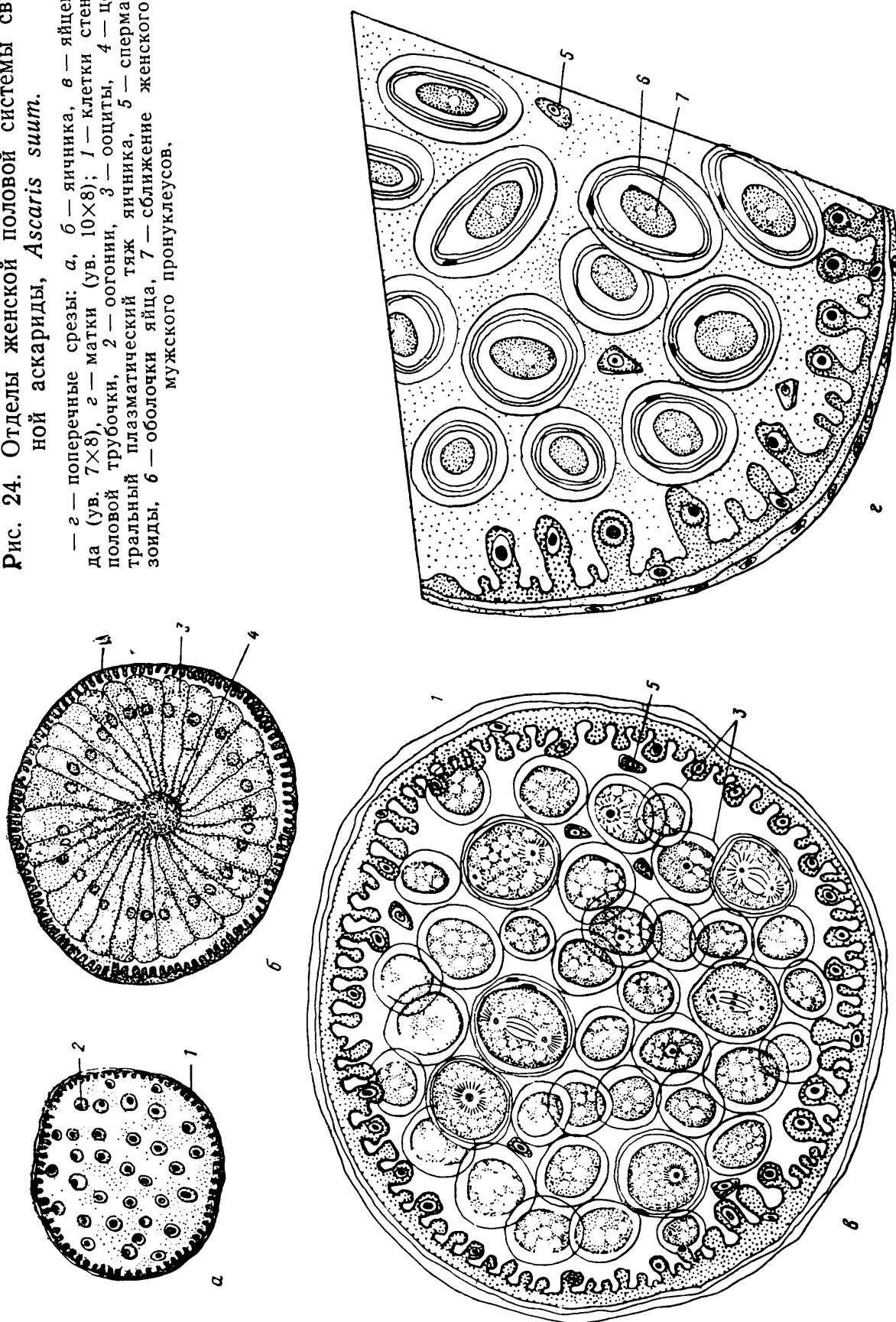
Оогенез и оплодотворение. Для получения препаратов женских половых клеток на разных стадиях формирования и картин оплодотворения яичник, яйцевод и матку аскариды разрезают на части длиной около 2—3 см и фиксируют в жидкости Карнуа в течение часа. После фиксации материал обезвоживают в абсолютном спирте и, проведя через целлоидин — касторовое масло и хлороформ, заливают в парафин. Приготавливают поперечные срезы толщиной 8—10 мкм и окрашивают железным гематоксилином по Гейденгайну. Предметные стекла следует тщательно обезжировать и окрашивать препараты при комнатной температуре, не подвергая нагреванию, иначе срезы, имеющие небольшую площадь, легко отклеиваются и теряются.

В дистальном конце яичника находится зона размножения (рис. 24, а) оогониев, где мелкие половые клетки, образующиеся в результате митотических делений, лежат неупорядоченно. В зоне роста (рис. 24, б) половые клетки — ооциты, плотно сжаты в трубке яичника и имеют клиновидную форму. Они прикреплены к центральному осевому плазматическому стержню — *gnathis* — выполняющему, по мнению ряда авторов, трофическую функцию. Ооциты обращены к рахису вегетативным полюсом, впоследствии становящимся вентральной стороной зародыша. Закончившие рост ооциты свободно лежат в просвете гонады, которая в этом участке носит название яйцевода. В яйцеводах (зона созревания) (рис. 24, в) среди ооцитов встречаются сперматозоиды, имеющие коническую форму и лишенные «хвостика». Редукционные деления ооцита происходят уже после проникновения в него спермия. В процессе двух делений созревания выделяются два редукционных тельца, кроме того, яйцо окружается двумя оболочками. Наружная носит название глянцевиной, внутренняя — волокнистой. Первое редукционное тельце располагается между этими оболочками, второе — лежит под волокнистой оболочкой и прилегает непосредственно к клеточной мембране яйца.

В матке (зона оплодотворения) (рис. 24, г) происходит сближение мужского и женского пронуклеусов и соединение их почти в центре яйца. После оплодотворения между яйцом и оболочками возникает полость (перивителлиновое простран-

Рис. 24. Отделы женской половой системы свиной аскариды, *Ascaris suum*.

— 2 — поперечные срезы: а, б — яичника, в — яйцевода (ув. 7×8), г — матки (ув. 10×8); 1 — клетки стенки половой трубочки, 2 — оогонии, 3 — ооциты, 4 — центральный плазматический тяж яичника, 5 — сперматозоиды, 6 — оболочка яйца, 7 — сближение женского и мужского пронуклеусов.

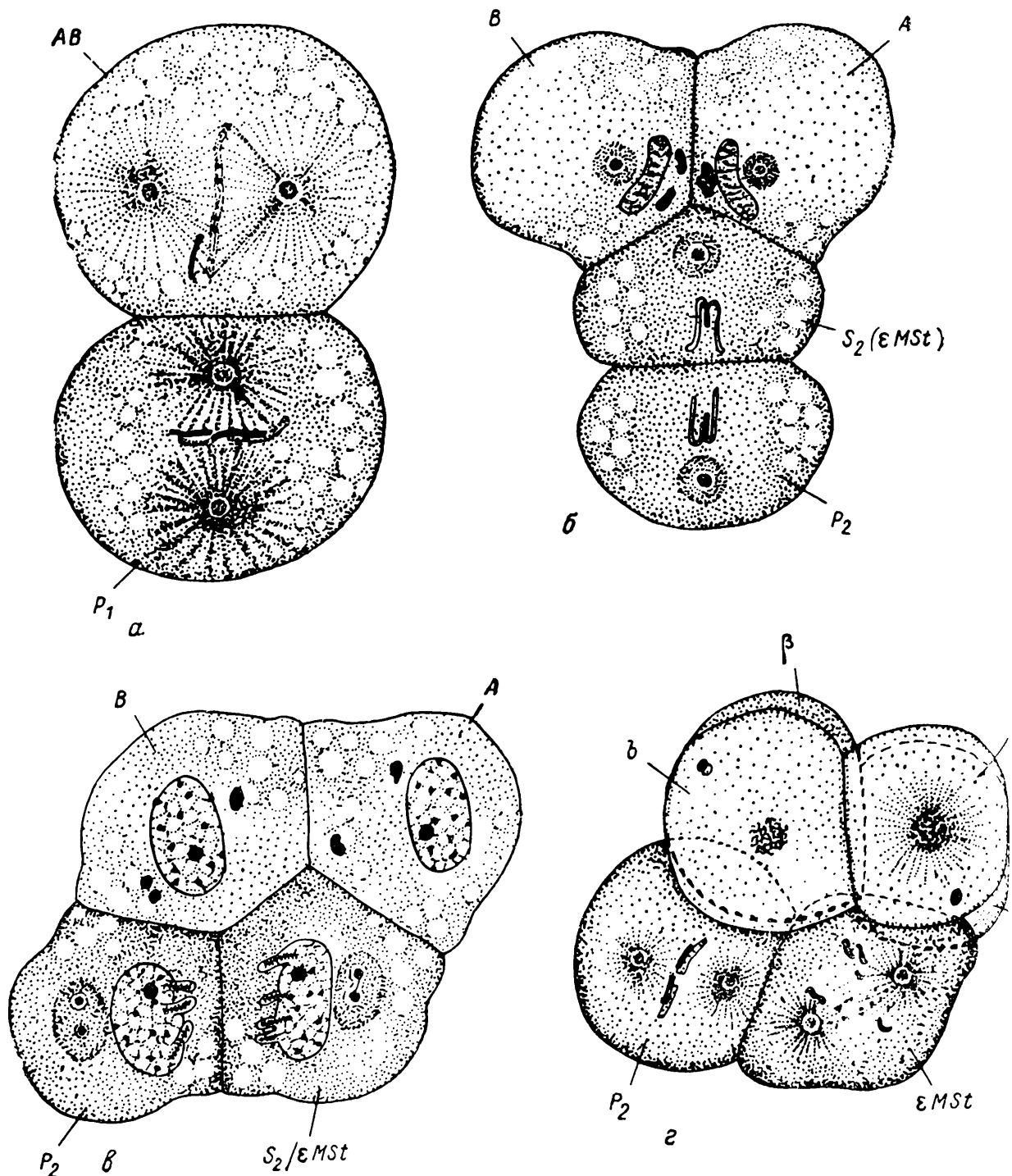


ство). На поперечных срезах через матку можно видеть большое количество яиц, окруженных несколькими оболочками. Непосредственно к яйцу прилегает так называемая волокнистая оболочка, поверх нее располагается глянцевитая, за которой следует белковая оболочка. Две первые оболочки, как уже упоминалось, выделяются самым яйцом, и, следовательно, являются первичными. Третья — белковая оболочка, образуется за счет деятельности стенок матки и, таким образом, является третьей. Средняя, глянцевитая оболочка у свиной аскариды, по данным одних авторов, имеет два слоя, по данным других — три (так же, как и у лошадиной аскариды). Благодаря этим оболочкам зародыши аскариды могут долгое время оставаться жизнеспособными в среде, богатой различными продуктами гниения.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Для получения зародышей свиной аскариды на разных стадиях развития кусочки матки (длиной около 2 см) инкубируют в чашке Петри с водопроводной водой. Вода должна лишь прикрывать кусочки матки, поскольку для развития зародышей аскариды необходимо достаточное количество кислорода. Чашки Петри с яйцами аскариды помещают в термостат и содержат при оптимальной для развития температуре 28°C. В этих условиях начало дробления — образование двух бластомеров — наступает через 2—3 дня; четыре бластомера возникают через 3—4 дня; шесть-восемь бластомеров появляются на 4—5 день; начало гастрюляции наблюдается через 6—7 дней; рабдитисовая личинка развивается на 13-й день инкубации [Завадовский, Сидоров, 1927]. Яйца свиной аскариды развиваются не вполне синхронно. Ежедневно зародышей извлекают из отрезков инкубируемой матки, помещают на предметное стекло в каплю воды, прикрывают покровным стеклом и изучают под большим увеличением микроскопа. Убедившись в том, что зародыши находятся на нужной стадии развития, их зарисовывают, а кусочки матки подвергают гистологической обработке по ранее указанному способу. Окрашенные срезы также изучают под большим увеличением микроскопа или под иммерсионным объективом.

Нераздробившиеся яйца свиной аскариды имеют овальную форму, диаметр по длинной оси около 60 мкм, диаметр в поперечнике — приблизительно 45 мкм. Небольшое количество желтка распределено равномерно, поэтому полярность яйца внешне выражена неясно. Анимальный полюс отмечен только положением второго редукционного тельца. Дробление у аскариды полное, почти равномерное, билатерально-симметричное и имеет детерминированный характер. Расположение бластомеров строго постоянное, что дает возможность проследить их



генеалогии и производные. Бластомеры принято обозначать в системе, предложенной Бовери в 1899 г.

На срезах через матку, инкубированную в течение разного времени в термостате, можно получить все стадии эмбрионального развития. Однако большинство зародышей ориентированы на препарате неправильно, и требуются некоторые усилия, чтобы найти зародыши, на которых можно изучать все характерные особенности каждой стадии.

Стадия 2 бластомеров. Первое деление происходит по экватору и приводит к образованию 2 бластомеров — анимального и вегетативного (рис. 25, а). Веретено первого деления яйц

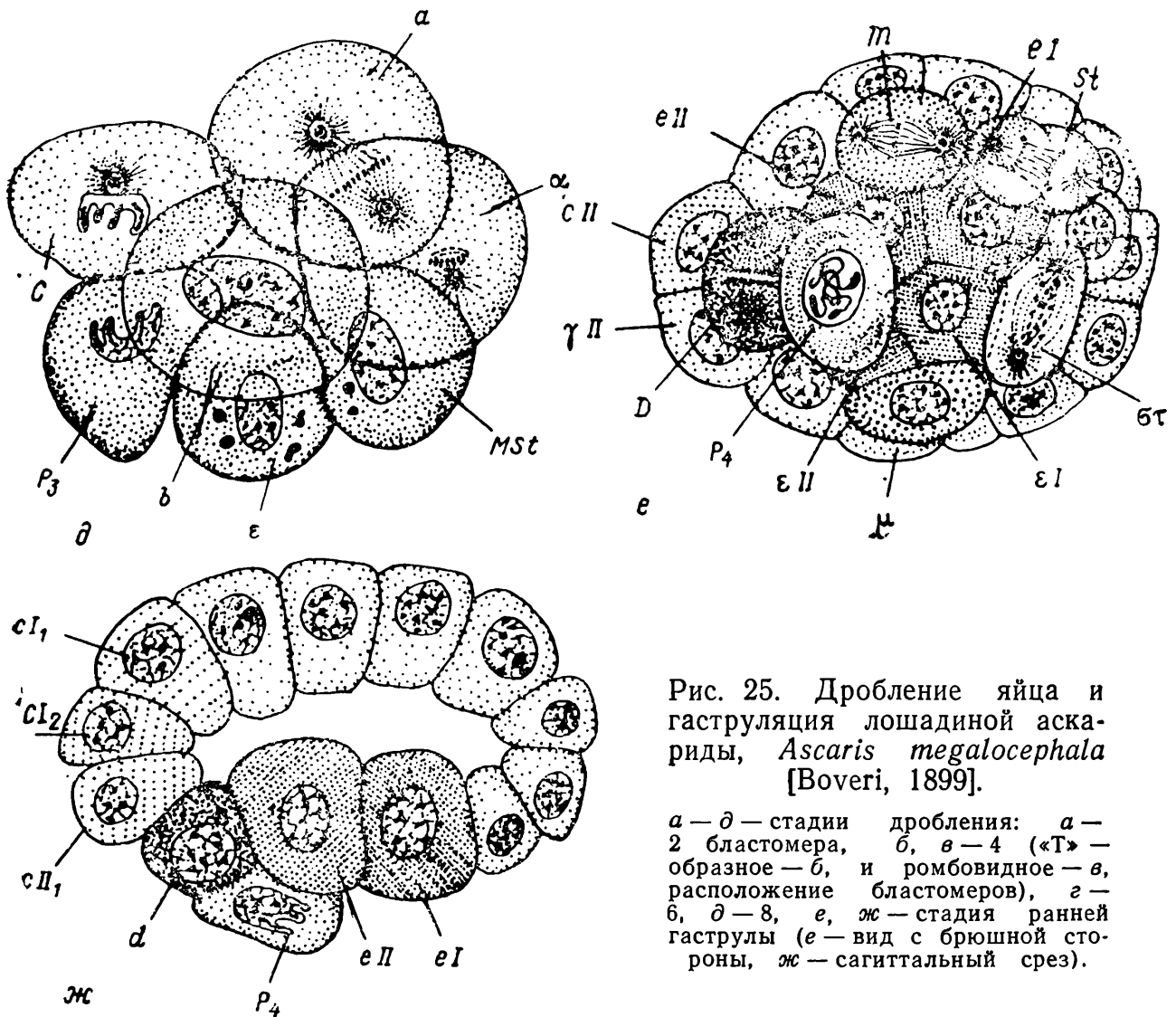


Рис. 25. Дробление яйца и гастрюляция лошадиной аскариды, *Ascaris megalocephala* [Boveri, 1899].

a — d — стадии дробления: *a* — 2 бластомера, *б, в* — 4 («Г» — образное — *б*, и ромбовидное — *в*, расположение бластомеров), *г* — 6, *д* — 8, *е, ж* — стадия ранней гастрюлы (*е* — вид с брюшной стороны, *ж* — сагиттальный срез).

сначала располагается, как и у всех животных, в экваториальной плоскости, затем поворачивается и ложится по анимально-вегетативной оси. Анимальный бластомер АВ немного больше вегетативного P_1 , но содержит меньше желтка. Бластомер АВ представляет собой зачаток большей части эктодермы, а P_1 включает материал разнородных зачатков, в том числе и полового.

Стадия 4 бластомеров. Дальнейшее дробление протекает не вполне синхронно, так как бластомер АВ делится раньше бластомера P_1 , причем дробление идет в разных плоскостях: АВ делится в меридианальной, а P_1 — в широтной. О направлении

делений первых двух бластомеров можно судить по положению митотических веретен (рис. 25, а). В результате бластомер AB разделяется на правый бластомер A и левый — B , а P_1 — на вегетативную клетку P_2 и клетку S_2 , располагающуюся в экваториальной части яйца, из которой впоследствии развиваются энтодерма, мезодерма и передняя кишка, почему этот бластомер обозначают также $\mathcal{E}MSt$ (энто-мезо-стомодум — рис. 25, б, в).

Деление клетки AB сопровождается явлением, получившим название диминуции хроматина. На стадии анафазы хромосомы отбрасывают утолщенные концы, которые не попадают в дочерние ядра, а дегенерируют (рис. 25, б, в). В цитоплазме клеток A и B видны комочки отброшенного хроматина. Диминуция хроматина никогда не происходит в клетках линии, ведущей к половому зачатку (P_1, P_2, P_3, P_4). Значение этого явления до сих пор не вполне ясно.

Бластомеры четырехклеточной стадии сначала располагаются в форме буквы T (рис. 25, б), но вскоре бластомер P_2 , смещаясь, ложится в углубление между бластомерами B и $\mathcal{E}MSt$ и зародыш приобретает форму ромба (рис. 25, в). Если дорсовентральная ось зародыша, соответствующая анимально-вегетативной оси яйца, определена с самого начала развития, то предне-задняя ось и медианная плоскость определяются только на ромбовидной стадии. Бластомеры A и $\mathcal{E}MSt$ лежат на будущем переднем конце зародыша, B и P_2 — на заднем.

Стадия 6—8 бластомеров. При следующем делении бластомеры A и B опять опережают клетки P_2 и $\mathcal{E}MSt$, так что получается стадия шести бластомеров (рис. 25, г). Клетки A и B делятся в сагиттальной плоскости. При этом вновь образующиеся правые бластомеры обозначают a и b , а левые — α и β . Затем приступают к делению вентральные клетки; $\mathcal{E}MSt$ делится на переднюю MSt и заднюю (чисто энтодермальную) \mathcal{E} клетки, а P_2 — на вентральную P_3 и дорсальную S_3 (вторичная эктодерма). При делении $\mathcal{E}MSt$ снова наблюдается диминуция хроматина. Таким образом, возникают восемь бластомеров (рис. 25, д).

Далее первыми делятся снова дорсальные бластомеры, а вентральные — несколько запаздывают, поэтому формируется сначала 12-клеточный зародыш, а затем — 16-клеточный. Со стадии 16 бластомеров дробление окончательно утрачивает синхронность. По мере увеличения количества клеток изучение дробления становится более трудным и требует много времени и терпения. Эти стадии подробно описаны Бовери.

Стадия гастрюлы. Гастрюляция начинается на стадии 32 бластомеров, во время которой (рис. 25, е, ж) происходит полное разделение основных зачатков. Эктодерма представлена производными клеток A и B ; в результате деления бластомера $\mathcal{E}MS$ образуются зачатки энтодермы ($\mathcal{E}I, \mathcal{E}II, eI, eII$), мезодермы

(*m* и *μ*) и стомодеума (*St* и *στ* — стоматобласты); после разделения бластомера *P*₃ возникает клетка *S*₄ (третичная эктодерма) и обособляется половой зачаток *P*₄. В это время зародыш представляет собой целобластулу. При рассмотрении зародыша с вегетативного полюса видно, что клетки энтодермальной пластинки (*ε*I, *ε*II, *e*I, *e*II), имеющей форму ромба, начинают погружаться внутрь, сзади на энтодерму нарастают половой зачаток *P*₄ и третичная эктодерма *S*₄, а спереди — стоматобласты. Затем внутрь уходят клетки мезодермы *m* и *μ*. Из стоматобластов образуется клеточная пластинка, которая впячивается и дает начало стомодеуму. Последними уходят внутрь клетки полового зачатка *P*₄.

Итак, гастрюляция происходит путем погружения внутрь плотных клеточных комплексов, на которые нарастает эктодерма. На рис. 25, ж изображен сагиттальный срез зародыша на стадии ранней гастрюлы, на котором видно начало погружения крупных клеток энтодермальной пластинки в бластоцель. Образующееся на месте погружения клеток временное вдавление представляет собой бластопор. Возникающий после впячивания стомодеума рот ограничен стоматобластами, которые во время гастрюляции составляли передний край бластопора.

Клетки энтодермы, оказавшиеся внутри, продолжают делиться и образуют плотную клеточную массу. По бокам от нее располагаются две группы мезодермальных клеток. Когда зародыш начинает удлиняться, из них образуется энтодермальный тяж — зачаток средней кишки, и две мезодермальные полосы.

В ходе эмбрионального развития аскариды из эктодермы формируются кожные покровы, выделительные каналы, нервная система, задняя кишка, из энтодермы — средняя кишка, из мезодермы — мускулатура, из двух клеток полового зачатка — оогонии или сперматогонии.

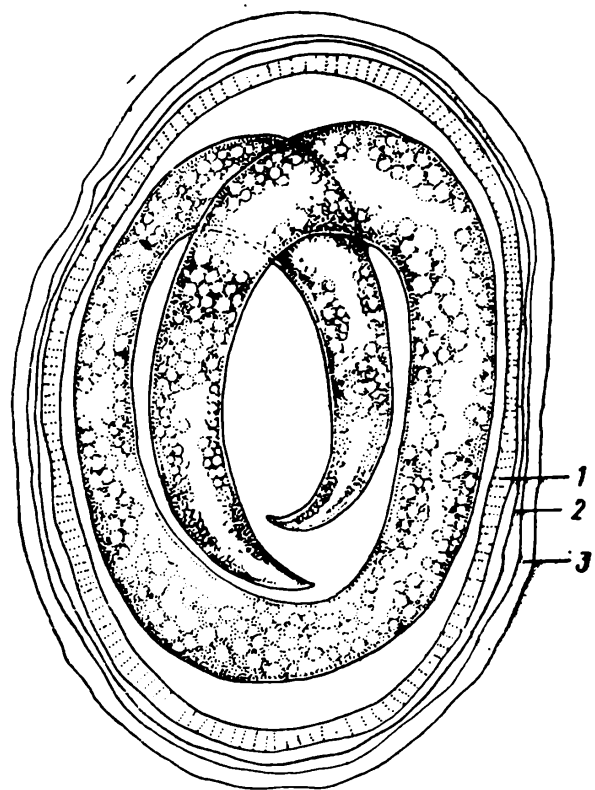


Рис. 26. Рабдитисовая личинка свиной аскариды, *Ascaris suum* (прижизненно).

1—3 — оболочки (1 — волокнистая, 2 — глянцевитая, 3 — белковая).

Поздний зародыш. По завершении гаструляции начинаются процессы органогенеза. На 8-й день инкубации зародыш свиной аскариды удлиняется и начинает изгибаться. В этот период его передний конец тупой и утолщенный, в связи с чем этот этап развития называют стадией головастика. На 10-й день передний и задний концы зародыша начинают соприкасаться, а на 11—12-й день он еще больше вытягивается и дважды закручивается внутри яйцевых оболочек. К этому времени передний конец зародыша также заостряется, червь приобретает подвижность внутри яйцевых оболочек (13-й день развития). Сформированная рабдитисовая личинка (рис. 26) долго остается живой внутри яйца и прорывает яйцевые оболочки только когда попадает в кишечник хозяина.

МНОГОЩЕТИНКОВЫЕ ЧЕРВИ

Полихеты относятся к типу Annelida и сохраняют наиболее примитивный для этих червей тип развития. Большинство полихет морские животные. В качестве основного объекта наблюдений можно использовать беломорскую полихету *Nereis virens* или какого-нибудь другого представителя рода *Nereis*, широко распространенного в наших морях. Развитие американских видов *N. limbata* и *N. megalops* подробно изучено Вильсоном. Кроме того, рекомендуется познакомиться с встречающимися в планктоне личиночными стадиями других видов полихет.

1. РАЗВИТИЕ *Nereis virens*

Нереиды раздельнополы. Животные обычно ведут придонный образ жизни, но в период нереста половозрелые самки и самцы всплывают к поверхности моря и выметывают половые продукты. В период размножения нереиды претерпевают характерные изменения. Половые продукты развиваются почти во всех сегментах тела. Окраска тела становится ярче, за счет просвечивания сквозь покровы массы яиц или спермы. Количество яиц, производимое одной самкой, очень велико и исчисляется тысячами. Половые продукты выходят наружу через разрывы стенки тела, так как специальных половых протоков нет.

В Белом море размножение *N. virens* происходит в конце или середине июня при температуре воды $+9^{\circ}\text{C}$. Нерест нереид, как правило, начинается в штилевые ночи. Животные собираются группами и роятся у поверхности моря. Самцов и самок вылавливают сачками и помещают каждое животное отдельно в небольшие садки емкостью 0,5—1 л. Самцы *N. virens* имеют беловатую окраску, самки — зеленоватую. Методика искусственного осеменения яиц *N. virens* разработана в лаборатории цитологии Ленинградского университета А. К. Дон-

дуа. Оптимальная температура для искусственного осеменения яиц *N. virens* +12°C. Для успешного развития зародышей лучше использовать первую партию яиц, выметанных одной самкой. Отобранные яйца выдерживают в течение трех часов в фильтрованной морской воде, а затем производят осеменение. Берут 3—4 капли «густой» спермы от самца и разводят в 20 мл морской воды, после чего около двух миллилитров взвеси спермиев добавляют в чашку Петри со зрелыми яйцеклетками. Спустя 10 мин яйца нерейд отмывают в нескольких порциях морской воды. После проникновения спермия в яйцо возникает оболочка оплодотворения, которая сильно разбухает, и диаметр яйца вместе с оболочкой увеличивается от 200 до 500 мкм. Осемененные яйца помещают в большие химические стаканы со свежей морской водой. Для лучшей аэрации развивающихся зародышей можно использовать «мешалки», вращающиеся со скоростью 60 оборотов в минуту.

Нормальное развитие *N. virens*, по данным А. К. Дондуа, протекает в следующие сроки. Выделение редуционных телец происходит в течение первых двух часов после осеменения. Первое деление зиготы у *N. virens* наблюдается через 6 ч. Через 12 ч большая часть зародышей находится на стадии 16 бластомеров, спустя 18 ч завершается период дробления. Гастрюляция наступает через 24 ч после оплодотворения и заканчивается после 36 ч. К этому времени зародыши начинают вращаться внутри оболочки.

Трохофора появляется через 60 ч, метатрохофора — к концу четвертых суток, а нектохета на шестые сутки. Превращение нектохеты в червя, о котором можно судить по появлению 1-го постларвального (четвертого щетинконосного) сегмента, происходит примерно через три недели после оплодотворения. Стадии развития *Nereis* можно изучать прижизненно и на тотальных препаратах.

Для изготовления препаратов фиксацию зародышей производят в смеси Галера (96%-ный спирт + глицерин + ледяная уксусная кислота — 1:1:1) или в жидкости Буэна. Зафиксированных в смеси Галера зародышей можно заключить в глицерин. Для приготовления более долговечных препаратов, заключенных в бальзам, зародышей проводят через ряд спиртов восходящей концентрации. После фиксатора Галера проводят начиная с 40%-го спирта, а после фиксатора Буэна можно начинать с 70%-го спирта. Обезвоживание проводят постепенно в течение 5—7 ч. Для того чтобы избежать сморщивания бластомеров и оболочки, нужно увеличивать концентрацию последующего спирта по сравнению с предыдущим не больше, чем на 10% и добавлять спирт по каплям. После 70%-го спирта зародышей можно окрасить в спиртовом растворе борного кармина, разбавив краситель 70%-ным спиртом до розового тона. Материал оставляют в красителе на сутки. Затем производят

дальнейшее обезвоживание и после 100%-го спирта зародышей переносят на несколько дней в касторовое или лучше гвоздичное масло или метил-бензоат, после чего материал закладывают в бальзам.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

2, 4 и 8 бластомеров. Яйца *N. virens* содержат большое количество желтка и относятся к телолецитальному типу.

У нерейд, как и у других полихет, яйца дробятся по спиральному типу. Спиральное дробление характеризуется тем, что после первых двух приблизительно меридиональных делений митотические веретена занимают наклонное положение, благодаря чему анимальные бластомеры оказываются сдвинутыми по отношению к вегетативным в дексиотропном (по часовой стрелке) или леотропном (против часовой стрелки) направлении на 45°. Обычно наблюдается правильное чередование дексиотропных и леотропных делений. Другая особенность спирального дробления состоит в том, что начиная со стадии 8 бластомеров клетки, занимающие вегетативное положение, отличаются более крупными размерами и поэтому называются макромерами. Такая неравномерность в дроблении объясняется тем, что в макромеры попадает большая часть желтка. Но у большинства полихет, кроме того, неравномерными являются и самые первые деления. Это связано с тем, что в вегетативной части яйца содержится особая «полярная плазма», имеющая формообразовательное значение, которая при первых делениях целиком переходит в один из бластомеров. Поэтому на стадии четырех бластомеров один из них отличается более крупными размерами. Такое дробление называется гетероквадрантным (в отличие от гомоквадрантного, при котором первые 4 бластомера одинаковы).

Характер спирального дробления строго закономерен, что дает возможность точно проследить генеалогию и последующую судьбу бластомеров. Поэтому при описании спирального дробления для обозначения бластомеров применяется система цифровых и буквенных индексов.

Меньший из образованных 2 бластомеров обозначают буквами *AB*, а больший — *CD* (рис. 27, *a*). На препаратах видно, что между бластомерами имеется полость, возле которой скапливается интенсивно окрашивающаяся цитоплазма. При работе микровинтом в обоих бластомерах хорошо заметны крупные округлые желточные включения.

При втором делении дробления бластомер *AB* делится равномерно на *A* и *B*, а *CD* — неравномерно, на меньшую клетку *C* и большую *D*; в результате возникают 4 бластомера, из которых *D* крупнее остальных (рис. 27, *b*). Более крупные размеры бластомера *D* есть первое проявление билатеральной сим-

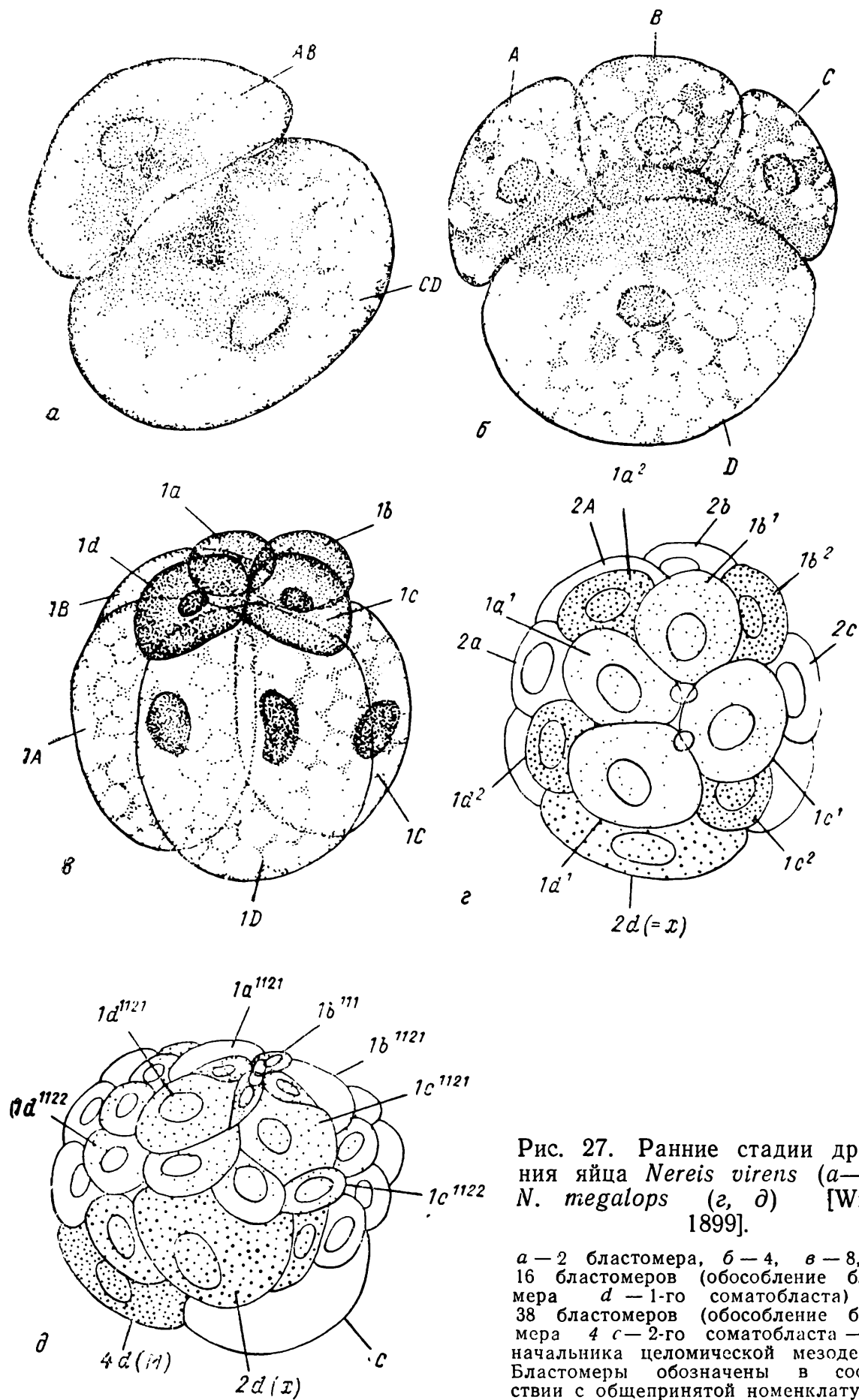


Рис. 27. Ранние стадии дробления яйца *Nereis virens* (а—в) и *N. megalops* (z, д) [Wilson, 1899].

а — 2 blastomeres, б — 4, в — 8, z — 16 blastomeres (separation of blastomeres d — 1st somatoblast) д — 38 blastomeres (separation of blastomeres 4 c — 2nd somatoblast — origin of cephalic mesoderm). Blastomeres are designated according to the generally accepted nomenclature.

метрии. На стадии 4 бластомеров predeterminedены главная ось и все стороны будущей личинки: анимальный полюс соответствует переднему концу личинки, вегетативный — заднему концу, бластомер *B* — брюшной, *D* — спинной стороне, *A* — левой и *C* — правой стороне; 4 бластомера представляют собой основной квартет, а каждый из них — квадрант (четверть зародыша).

При третьем дексиотропном делении у *N. virens* возникают 8 бластомеров: 4 анимальных микромера, *1a*, *1b*, *1c*, *1d* и 4 вегетативных макромера: *1A*, *1B*, *1C*, *1D*. Макро- и микромеры резко различаются по размерам (рис. 27, в) и, как видно на препаратах, микромеры более интенсивно окрашены (последнее объясняется тем, что микромеры почти не содержат желтка). Среди макромеров *4D* крупнее остальных, поскольку в него попадает большая часть «полярной плазмы».

При последующем дроблении происходит чередование леотропных и дексиотропных делений и образование новых кварталов микромеров: 2-й квартет (*2a—2d*) образуется после 4-го (леотропного) деления (рис. 27, г), 3-й квартет (*3a—3d*) после 5-го (дексиотропного) деления (рис. 27, д), а 4-й (*4a—4d*) — после 6-го (снова леотропного) деления. Одновременно делятся и ранее образовавшиеся микромеры. Начиная со стадии 64 бластомеров, дробление становится менее синхронным, начинается гастрюляция, которая у разных видов *Nereis* осуществляется плотным вращением или эпиболией. У полихет в процессе гастрюляции потомки трех первых кварталов микромеров остаются на поверхности и дают начало эктодерме. За счет первого квартета микромеров образуются кожные покровы верхнего полушария трохофоры, за счет второго и третьего кварталов микромеров возникают покровы нижнего полушария трохофоры, причем особенно важную роль играет бластомер *2d* (1-й соматобласт), который отличается от других микромеров более крупными размерами. Четвертый квартет микромеров и макромеры попадают при гастрюляции внутрь зародыша и образуют энтодерму. Бластомер *4d*, второй соматобласт, кроме энтодермы, дает начало двум мезодермальным телобластам. Из энтодермы возникает средняя кишка, а мезодермальные телобласты становятся источником образования большей части дефинитивной мезодермы.

Трохофора. Постэмбриональное развитие *Nereis virens* описано В. А. Свешниковым. В яйце *N. virens* формируется личинка — трохофора, которая имеет шаровидную форму (рис. 28, а). По экватору личинки проходит предротовой венчик ресничек — прототрох. На брюшной стороне непосредственно под прототрохом располагается ротовое отверстие, которое ведет в изогнутый слепо замкнутый кишечник. Прижизненно кишечник различается плохо; он выглядит как скопление желточных гранул. Анальное отверстие возникает позже при

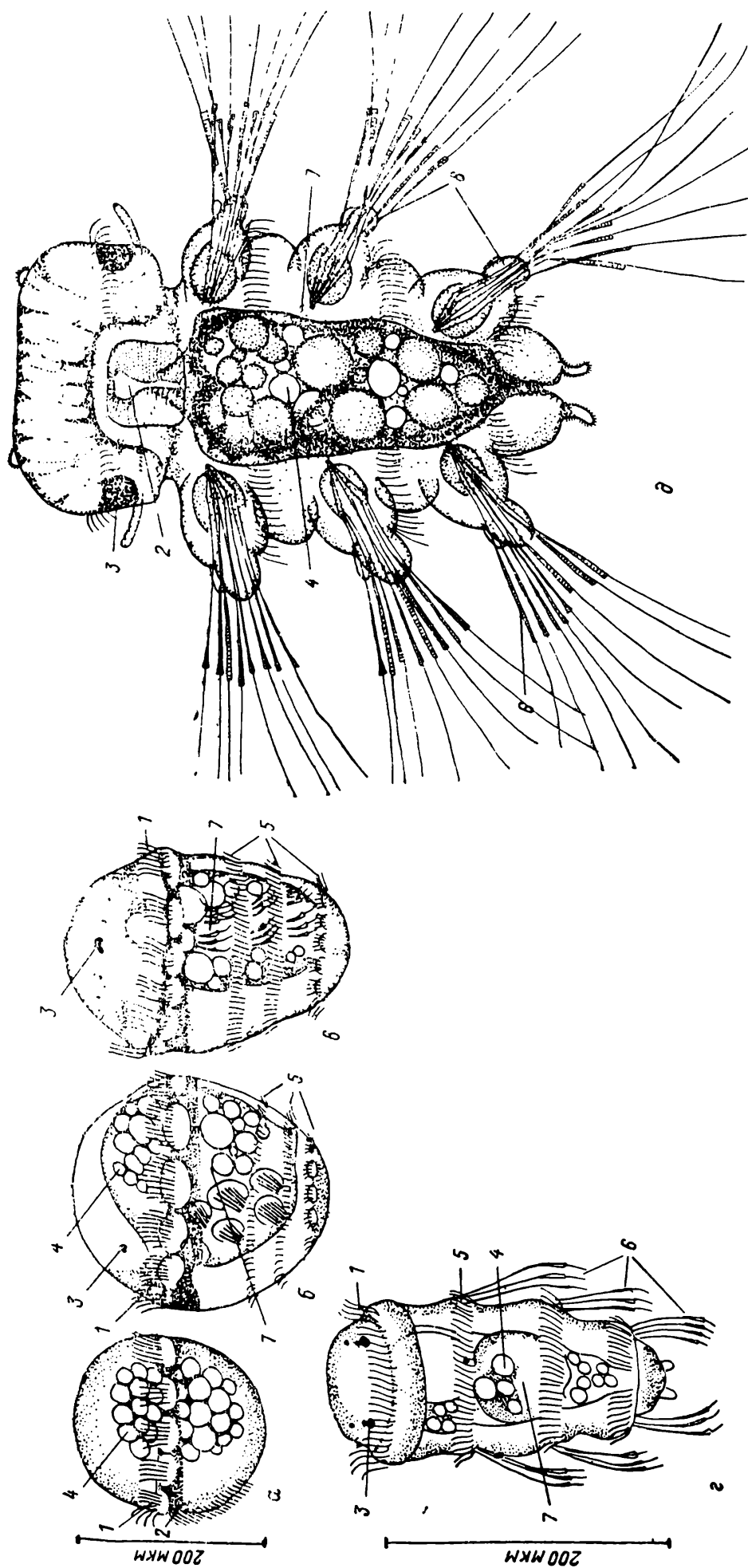


Рис. 28. Постэмбриональное развитие полихеты *Nereis virens* (а—г — по: Свешников, 1978).

а — трохофора, б — метатрохофора I, в — метатрохофора II, г — поздняя метатрохега, 1 — глаз, 2 — рот, 3 — глаз, 4 — желток, 5 — паратрох, 6 — кишечник, 7 — нефидий, 8 — пароподии.

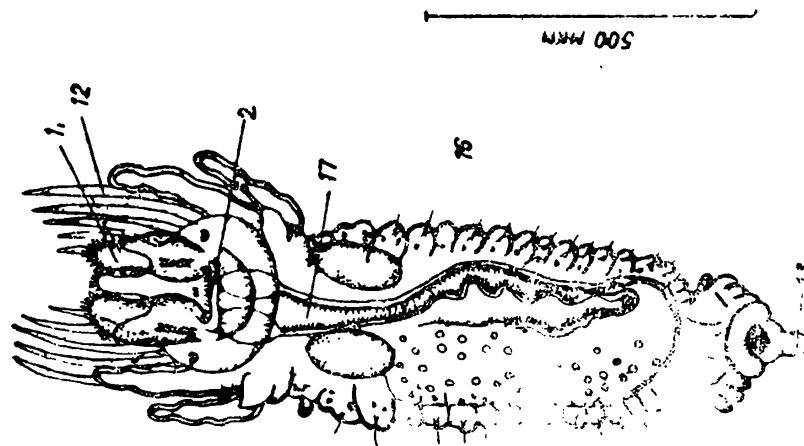
переходе к стадии метатрохофоры. Между стенкой тела и кишечником находится первичная полость тела (бластоцель).

Метатрохофора. Следующая стадия развития — метатрохофора — отличается от трохофоры появлением на ее нижнем полушарии признаков сегментации. Последняя проявляется у *Nereis virens* в образовании трех дополнительных ресничных колец (паратрохов) и зачатков щетинконосных мешков (трех пар дорсальных и трех пар вентральных). Эти первые сегменты получили название ларвальных. На верхнем полушарии личинки появляется пара красных глазков (рис. 28, б). Тело метатрохофоры постепенно вытягивается (рис. 28, в). На этой стадии развития оформляется ресничный пищевод и формируется анальное отверстие. Паратрохи располагаются на равном расстоянии от прототроха и друг от друга.

Нектохета. На этой стадии плавание личинки осуществляется с помощью пароподий и щетинок. При переходе к стадии нектохеты (рис. 28, г) тело личинки еще более вытягивается. На эписфере ранней нектохеты появляются еще две пары более крупных глаз. Образуются сначала сглаженные, а затем более выпуклые бугорки пароподий. Пучки щетинок торчат далеко за пределы тела. Но на каждом сегменте все еще сохраняется паратрох. Поздняя нектохета изображена на рис. 28, д. В теле личинки различается головной отдел, который имеет почти шаровидную форму и резко отграничен от первого щетинконосного сегмента тела. На голове имеются пара антенн и пара почти шаровидных палъп. Кишечник состоит из трех отделов: глотки, средней и задней кишки. Окончательно формируется хвостовая лопасть (пигидиум) с анальным отверстием на спинной стороне. Пигидиум несет пару анальных усиков, опушенных ресничками. На этой стадии развития личинка оседает на дно и переходит к ползанию. Личиночные паратрохи постепенно исчезают, окончательно резорбируется желток, в большом количестве имеющийся в среднем отделе кишки у более ранней нектохеты. Некоторое время образования новых сегментов не наблюдается: пауза в развитии сегментов продолжается обычно два-три дня.

Затем рост возобновляется, новые сегменты возникают теперь не все одновременно, как личиночные, а формируются постепенно один за другим в небольшой области впереди анального отверстия — в препигидиальной зоне роста. Эти сегменты в отличие от личиночных (ларвальных) носят название постларвальных.

Личиночные стадии *Harmothoe imbricata* (сем. Aphroditidae). *H. imbricata* часто встречается на литорали Белого и Баренцева морей. Развитие зародышей протекает у *Harmothoe* под элитрами самки, а личиночные формы в большом количестве встречаются в планктоне. Трохофоры, способные самостоятельно питаться диатомовыми водорослями, выходят в планк-



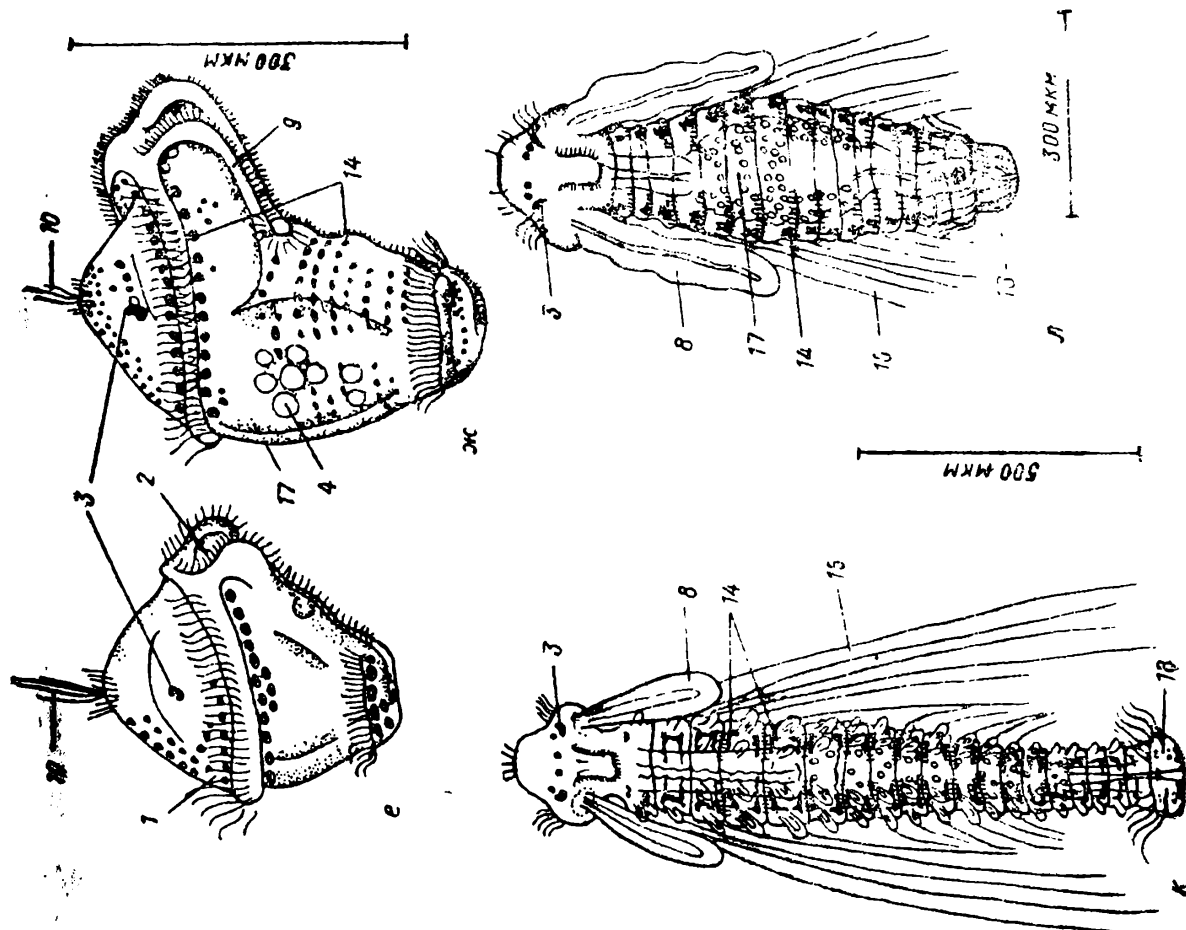


Рис. 29. Личиночные формы некоторых видов полихет [Свешников, 1978].

а — *Natipolthea imbricata* (а — трохофора, б, в — метатрохофоры I и II, г — нектохета и д — молодое личное животное); е — з — *Restinaria borealis* (е — трохофора, ж — метатрохофора, з — нектохета); и, к — сем. Spionidae (и — нектохета *Polydora ciliata*, к — нектохета *Spio filicornis*); л — нектохета *Rukorsis elegans*; 1 — прототрох, 2 — рот, 3 — глаза, 4 — желток, 5 — пучок рудых ресничек, 6 — паранодия, 7 — эпитры, 8 — пальцы, 9 — ротовые лопасти, 10 — апикальный орган, 11 — щупальца, 12 — опало, 13 — скафа, 14 — меланоборы, 15 — промоторные щетинки, 16 — дефинитивные щетинки, 17 — кишка, 18 — ригидкум.

тон в Белом море — в мае, в Баренцевом — в июне. Трохофора имеет шарообразную форму, ее диаметр 250—400 мкм (рис. 29, а). Прототрох, проходящий немного выше экватора, состоит из трех рядов ресничек. С левой стороны от рта имеется пучок длинных рулевых ресничек. Кишечник сквозной. Пищевод, выстланный мелкими ресничками, поднимается от рта вверх и впадает в среднюю кишку, в которой отмечаются две камеры, отделенные перегородкой. Задняя кишка короткая и заканчивается анусом на спинной стороне тела. Стенка средней кишки заполнена желточными гранулами красного или сиреневого цвета.

На стадии метатрохофоры (рис. 29, б, в) личинка длиной 600 мкм приобретает яйцевидную форму. У нее имеются 8 пар щетинконосных мешков, что соответствует 8 ларвальным сегментам. Зачатки пароподий расположены в три ряда, зачатки среднего ряда развиваются в элитры — крышечки. У нектохеты длиной 850 мкм (рис. 29, г) элитры становятся плоскими. Молодые донные особи (рис. 29, д) появляются через полтора месяца после начала развития, т. е. в июне, и оседают в зоне ламинарий.

Личиночные стадии *Pectinaria koreni* (сем. Amphicteniidae) — трохофора и метатрохофора, изображены на рис. 29, е, ж. Эта полихета размножается в Белом море в конце июля. Животные выметывают половые продукты в воду. Трохофора длиной около 130 мкм имеет на эписфере апикальный пучок чувствительных ресничек и пару красных глазков. Прототрох состоит из одного ряда ресничек. Впереди рта имеются лопасти, способные сокращаться и вытягиваться, на заднем конце — мощный телотрох. На эписфере, а также вдоль прото- и телотроха располагаются меланофоры темно-зеленого цвета (отличительный признак личинок *Pectinaria*). У метатрохофоры появляются сегменты, границы которых также отмечены пигментными пятнами. Ротовые лопасти сильно развиваются и могут служить для изменения направления движения. На стадии нектохеты личинка теряет ресничные образования (рис. 29, з) и совершенно меняет облик. Тело вытягивается до 1 мм, появляются 15—17 сегментов; голова небольшая, втянутая в передние сегменты, несет ряд придатков (антенны, щупальца, опухало и др.). Образуется скафа — задний отдел тела ромбической формы. Личинка в планктоне строит тонкую прозрачную трубочку и с ней опускается на дно.

Личиночные стадии спониид. В планктоне Белого и Баренцева морей в июне-июле в большом количестве встречаются крупные (около 1000 мкм) многосегментные личинки полихет из семейства Spionidae. Ранние стадии развития у многих спониид проходят в кладках (капсулах, слизи и пр.) и только у *Nereis*, *Aonides*, *Spiophanes* и *Prionospio* имеется пелагическая трохофора, покрытая специальной оболочкой. У многосегмент-

ных личинок спионид развиваются парные пучки длинных волосовидных щетинок, а также многочисленные реснички, располагающиеся полукольцами на спинной и брюшной сторонах сегментов и образующие так называемые «ресничные поля» (рис. 29, и, к, л). С помощью ларвальных щетинок и ресничных полей личинка с длинным многосегментным телом (иногда до 20 сегментов) держится в поверхностных слоях воды. По количеству глаз личинок спионид можно разделить на две группы. В первую входят личинки, имеющие две пары глаз (*Nerine*, *Laonice*, *Prionospio*, *Nerinides*, *Aonides*, *Spiophanes*), во вторую — личинки, обладающие тремя парами глаз (подсемейство *Spioninae* и род *Scoelelepis*). Характерными признаками личинок из сем. *Spionidae* являются длинные, иногда закрученные, легко отпадающие пальпы, а также крупные разветвленные и часто меняющие форму меланофоры (рис. 29, и, к, л).

НАСЕКОМЫЕ

На примере насекомых можно познакомиться с наиболее характерными особенностями развития в типе членистоногих. Материалом для наблюдений и изготовления учебных препаратов могут послужить яйца различных насекомых, собранных в природных условиях (в лесу, саду, поле, на огороде и т. д.). Кроме того, многие виды насекомых культивируются в различных энтомологических, физиологических и генетических лабораториях. Таким образом, круг возможных объектов очень широк, однако они не все одинаково удобны с технической и педагогической точки зрения. При выборе объекта нужно руководствоваться следующими соображениями: 1) яйца насекомых имеют очень разнообразную форму, но для изготовления правильно ориентированных срезов наиболее удобны удлиненные яйца с хорошо различающимися передним и задним концом, спинной и брюшной стороной. 2) Оптимальные размеры яиц составляют 0,5—1,5 мм; более мелкими яйцами трудно манипулировать, в более крупных содержится слишком много желтка, который плохо пропитывается реактивами и часто выкрашивается при микротомировании. В этом отношении более удобны яйца насекомых с полным превращением (*Holometabola*), так как относительное содержание желтка в них меньше, чем у насекомых с неполным превращением (*Hemimetabola*). 3) *Holometabola* имеют также то преимущество, что бластокинез у них упрощен и сводится к простому удлинению и укорочению зародышевой полоски, тогда как у *Hemimetabola* бластокинез связан с погружением зародыша в желток и его сложными изгибаниями и перемещениями, что тоже затрудняет приготовление хорошо ориентированных срезов. 4) Использование в качестве учебных объектов насекомых, развитие которых отличается от типичного, тоже нежелательно. Это относится в частности, к высшим представителям двукрылых (мухи) и пе-

репончатокрылых (пчелы, муравьи), у которых редуцированы характерные для насекомых эмбриональные оболочки. Поэтому в качестве типовых объектов мы рекомендуем бабочку-белянку *Pieris* и пилильщика *Pontania*. В том случае, если получить полный набор препаратов по развитию одного какого-нибудь вида насекомых не удастся, можно использовать препараты по разным видам.*

Если яйцевые оболочки достаточно прозрачны, изменения внешней формы зародыша можно проследить прижизненно или на тотальных препаратах, внутренние процессы развития следует изучать на срезах. Для фиксации яиц насекомых больше всего подходят смеси Карнуа и Буэна. Срок фиксации — около 1 ч. Для лучшего проникновения реактивов после фиксации (а еще лучше в самом фиксаторе) хорион следует проколоть тонкой препаровальной иглой, изготовленной из энтомологической булавки, контролируя свои действия под бинокулярной лупой. Прокалывать оболочки лучше на концах яйца, где они часто отстают от поверхности зародыша, или на спинной стороне, куда зародышевая полоска не заходит. Иногда (например, у *Pieris*) удается удалить хорион полностью. Все манипуляции удобно производить в неглубоких устойчивых чашечках типа лабораторных солонок.

Для изготовления тотальных препаратов яйца помещают в чашечку с дистиллированной водой, к которой добавляют несколько капель какого-нибудь гематоксилина (но не железного), так чтобы раствор оставался достаточно прозрачным. Длительность окрашивания зависит от концентрации красителя (обычно — несколько часов). Лучшие результаты дает более длительное окрашивание в слабом растворе краски. Если яйца окажутся перекрашенными, избыток краски можно оттянуть подкисленным спиртом. Получив окраску достаточной интенсивности, яйца промывают проточной водой, обезвоживают обычным способом и заключают в бальзам. Чтобы зародыши не были раздавлены покровным стеклом, под его уголки подкладывают какую-нибудь прокладку (например, кусочки воска, стекла или толстой бумаги). Для окраски тотальных препаратов можно использовать также квасцовый или борный кармин.

Для изготовления срезов яйца следует заливать в целлодин-парафин на целлоидиновых пластинках [см. Иванов, Полянский, Стрелков, 1981]. Срезы толщиной в 5—7 мкм окрашивают гематоксилином с докраской эозином. Яйца, предназначенные для заливки, можно предварительно окрасить тогально, благодаря чему они лучше видны в парафине, что

* Общие сведения по эмбриологии насекомых можно почерпнуть в учебных руководствах П. П. Иванова [1937] и О. М. Ивановой-Казас [1981]. Характеристика развития в разных отрядах насекомых дана в книге Йоганн-сена и Бата [Johannsen and Butt, 1941].

важно для правильной ориентировки срезов. Если яйца достаточно сильно прокрасить гематоксилином до заливки, то депарфинированные срезы можно сразу заключать в бальзам.

Личинок насекомых лучше фиксировать смесью Карнуа, так как этот фиксатор быстро пропитывает ткани. Перед фиксацией нужно отрезать задний конец личинки (в передней половине останутся интересующие нас части — имагинальные диски крыльев и средняя кишка).

1. ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ БАБОЧКИ *Pieris*

Бабочки-белянки капустница (*Pieris brassicae*) и репница (*P. rapae*)* широко распространены в нашей стране и поэтому являются легко доступными объектами. Они зимуют на стадии куколки и вылетают весной — в апреле или мае (в зависимости от географической широты). Еще через 3 недели начинается откладка яиц на нижнюю поверхность листьев капусты и других крестоцветных. Капустница откладывает яйца кучками по 20–30 штук, а репница — по одному.

Яйца белянок имеют удлиненную коническую форму; передний конец заостренный, а задний, которым они приклеиваются к листу, усечен. Длина яиц достигает 1,25 мм. На хорионе имеются продольные рубчики. Свежеотложенные яйца окрашены в желто-оранжевый цвет, но к концу эмбрионального развития (через 4–11 дней — в зависимости от температуры) приобретают сероватую окраску. Фаза гусеницы продолжается от 17 до 30 дней; за это время гусеница проделывает 5 линек (последняя из них — на куколку). Гусениц поздних возрастов и куколок можно использовать для изготовления препаратов по метаморфозу.

Сначала гусеницы, вышедшие из одной кладки, держатся вместе, но в конце личиночной жизни они расползаются. Поэтому для получения куколок нужно заранее собрать гусениц поздних возрастов, содержать их в небольших садках или банках, закрытых марлей, и кормить капустными листьями.

Для удобства изучения мы будем различать в эмбриональном развитии *Pieris* следующие стадии: 1) стадию только что отложенного яйца, на которой завершаются деления созревания и происходит объединение пронуклеусов (осеменение у насекомых внутреннее); эта стадия продолжается всего лишь 30–40 мин и поэтому в сборах встречается крайне редко; 2) стадию дробления; 3) стадию бластодермы; 4) стадию короткой зародышевой полоски; 5) стадию длинной зародышевой полоски; 6) стадию обрастания желтка и 7) стадию позднего зародыша. Однако не следует забывать, что развитие есть непр

* Эмбриогенез *P. rapae* подробно описан Истхемом [Eastham, 1927, 1930].

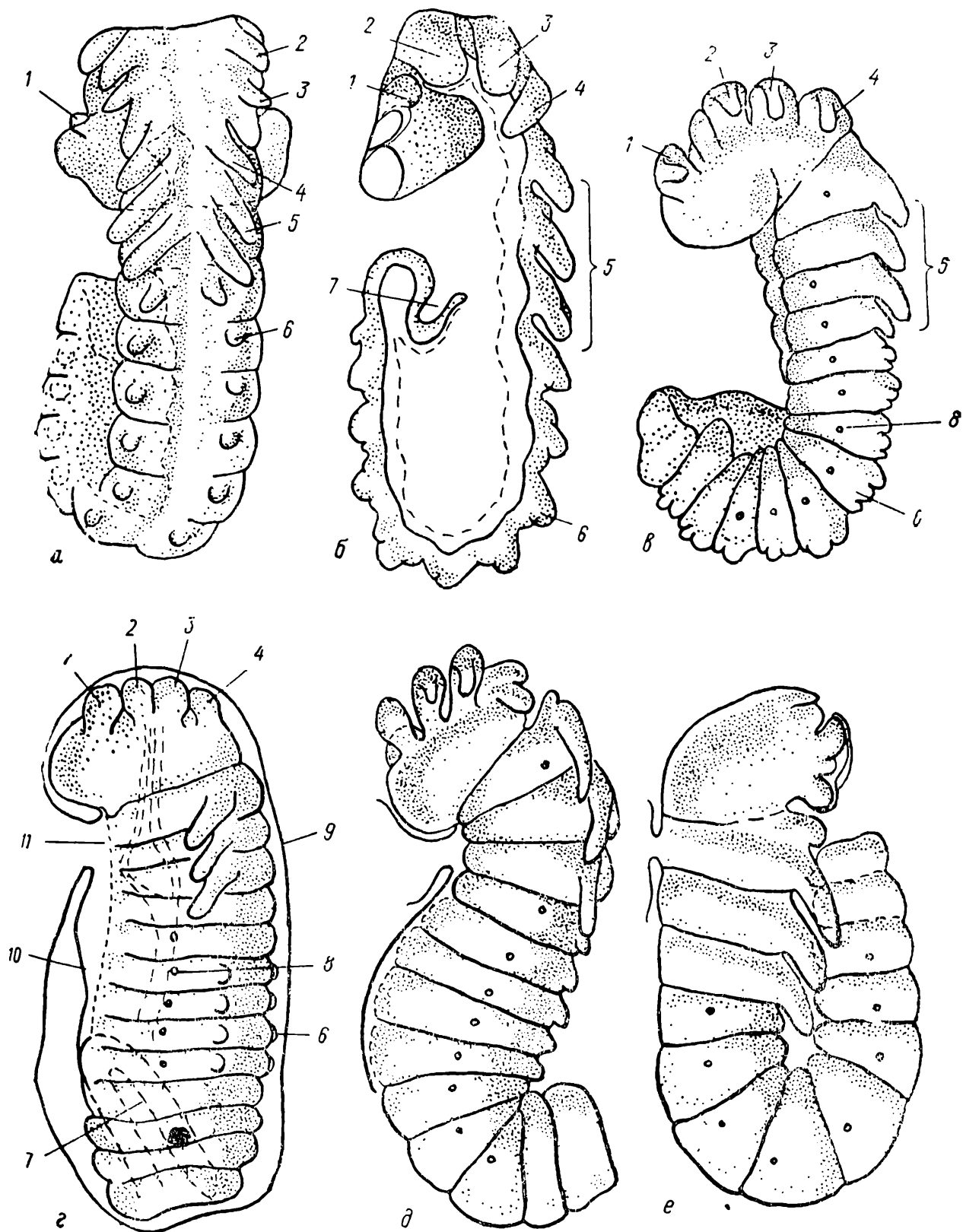


Рис. 30. Изменения внешней формы зародыша *Pieris rapae* [Eastham, 1930].
а, б — стадии длинной зародышевой полоски с брюшной стороны (а) и в профиль (б);
в — начало укорочения зародышевой полоски; г, д — стадии обрастания желтка, е —
поздний зародыш; 1 — антенны, 2 — мандибулы, 3 — максиллы, 4 — зачатки нижней
губы, 5, 6 — грудные (5) и брюшные (6) конечности, 7 — проктодеум, 8 — стигма, 9 —
амнион, 10 — провизорный эпителий спины, 11 — спинное отверстие.

рывный процесс и предлагаемое разделение его на стадии условно; эти стадии разграничены нерезко; на тотальных и гистологических препаратах могут оказаться зародыши, находящиеся на каких-то промежуточных стадиях развития (рис. 30).

Развитие зародышей протекает синхронно (т. е. все зародыши одной кладки находятся на одинаковой стадии развития), поэтому для получения полного набора стадий надо использовать зародыши из разных кладок. Обработку собранного материала следует начать с изготовления тотальных препаратов; это дает возможность определить, на какой стадии развития зафиксированы зародыши из каждой кладки и выбрать нужные для более трудоемкой гистологической обработки. Только самые ранние стадии (дробления, бластодермы, короткой зародышевой полоски) получаются на тотальных препаратах малодемонстративными.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Стадия дробления (поперечный срез). Яйца бабочек (как и большинства насекомых) относятся к центролецитальному типу и прodelывают поверхностное дробление. Получившееся в результате объединения мужского и женского пронуклеусов ядро (синкарион) лежит в середине яйца ближе к переднему

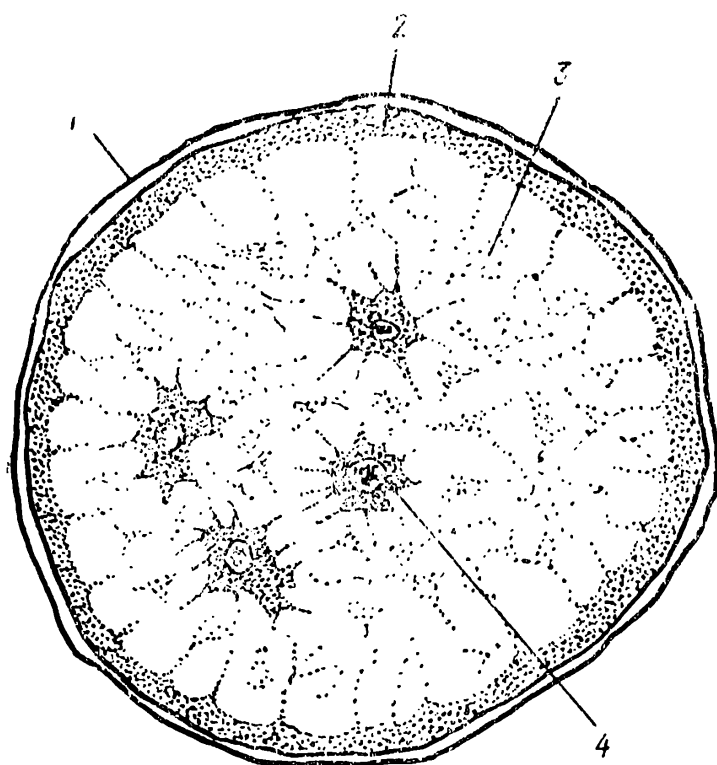


Рис. 31. Поперечный разрез через зародыш *Pieris rapae* на стадии дробления [Eastham, 1927].

1 — желточная оболочка, 2 — периплазма, 3 — желток, 4 — энергиды дробления.

концу. Оно окружено скоплением цитоплазмы, которое связано сетью тонких перемычек с поверхностным слоем цитоплазмы. Во время дробления происходит митотическое деление ядер и связанных с ними цитоплазматических островков, но клеточные границы не образуются. Таким образом, зародыш на стадиях дробления представляет собой синцитий; отдельные ядра с окружающей их цитоплазмой называются энергидами дробления.

С процессом дробления можно ознакомиться как по поперечным

речным срезам, так и по продольным. Мы даем описание поперечного разреза через яйцо *Pieris* (рис. 31). На поверхности округлого яйца различается тонкая желточная оболочка (хорион удален после фиксации; о том, как выглядит хорион на поперечном разрезе, дает представление рис. 39), а под ней — слой базофильной цитоплазмы (периплазма). В середине яйца находится масса желтка, представленного мелкими эозинофильными гранулами (на рис. 31 желток не изображен). В желтке можно видеть несколько энергид дробления. Их ядра имеют пузыревидную форму, а цитоплазма окрашивается очень интенсивно. Пронизывающие желток цитоплазматические тяжи различаются плохо, но о их существовании свидетельствуют звездообразные очертания энергид дробления.

По мере увеличения количества энергид дробления начинается их передвижение к периферии. Сперва они занимают небольшую область в передней части яйца («ядерная сфера»), которая постепенно расширяется (рис. 32, а). Окружающая

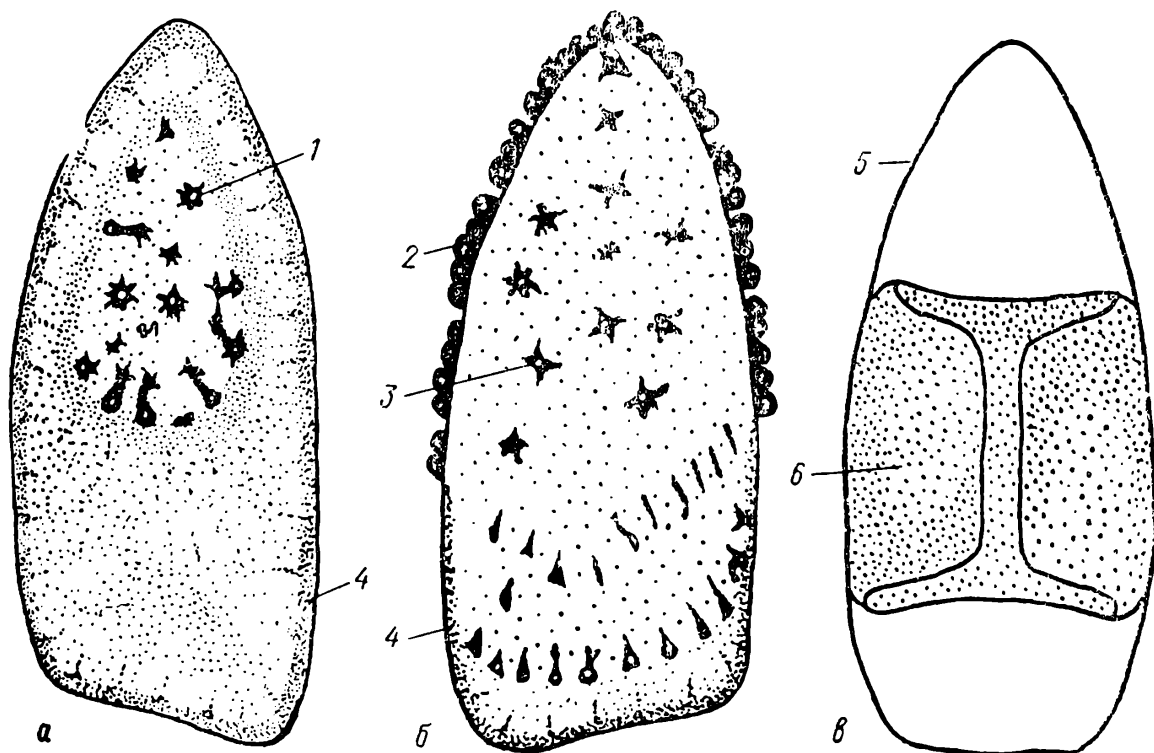


Рис. 32. Начальные стадии развития *Pieris rapae* [Eastham, 1927].

а — дробление, б — начало формирования бластодермы, в — короткая зародышевая полоска (схема, вид со спинной стороны); 1 — энергиды дробления, 2 — бластодерма, 3 — вителлофаги, 4 — периплазма, 5 — внезародышевая бластодерма, 6 — зародышевая полоска.

ядро цитоплазма имеет характерные кометообразные очертания — она как бы тянется за ядрами шлейфом. Затем энергиды дробления входят в периплазму, что приводит к образованию бластодермы. Этот процесс происходит не одновременно по

всей поверхности яйца — он начинается на переднем конце и постепенно распространяется назад (рис. 32, б).

Стадия бластодермы (поперечный срез). Формирование бластодермы завершается у *Pieris* приблизительно за 15—20 ч. Сперва бластодерма имеет синцитиальное строение, потом на ее поверхности появляются врезающиеся борозды, намечающие границы отдельных клеток. Еще позднее появляется мембрана, отграничивающая клетки бластодермы от центральной массы желтка. В бластодерме, изображенной на рис. 33, эта базаль-

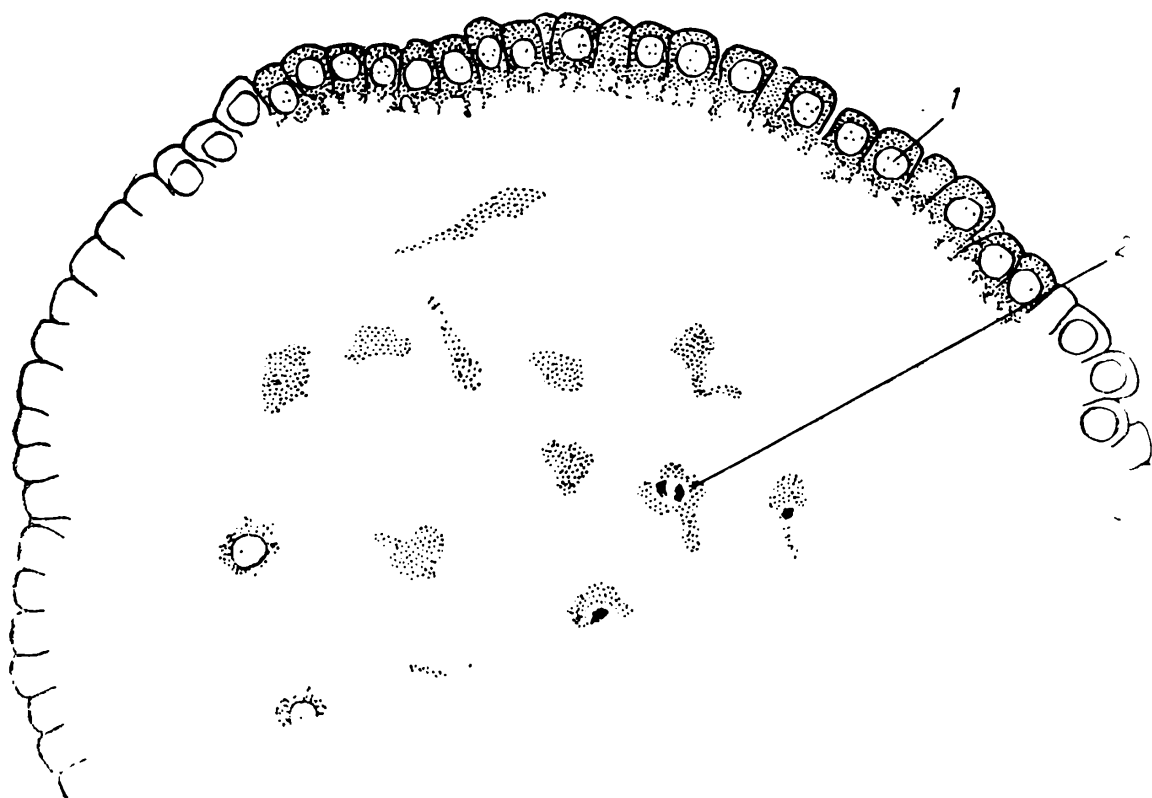


Рис. 33. Поперечный разрез через яйцо *Pieris brassicae* на стадии бластодермы. Ув. 7×40 .

1 — бластодерма, 2 — вителлофаги.

ная мембрана еще отсутствует. Ранняя бластодерма имеет характер кубического эпителия, составляющие ее клетки отличаются светлыми пузыревидными ядрами и базофильной цитоплазмой. На базальной стороне клеток цитоплазма образует короткие выросты, которые внедряются между поверхностными гранулами желтка.

В середине зародыша располагаются так называемые желточные ядра. Они образуются за счет энергид дробления, задержавшихся в толще желтка во время образования бластодермы. Желточным ядрам приписывают функцию переработки желтка, почему их называют также вителлофагами и рассматривают как рано обособившуюся часть энтодермы. Соответственно процесс образования желточных ядер расценивается как

1-я фаза гастрюляции. После обособления бластодермы масса желтка с заключенными в ней вителлофагами образует желточный синцитий.

Ранняя (короткая) зародышевая полоска (сагиттальный разрез). Зародышевая полоска формируется у насекомых путем стягивания клеток бластодермы к брюшной стороне зародыша. У разных насекомых в момент своего образования зародышевая полоска значительно варьирует по форме и размерам. Различаются зародышевые полоски 3 типов: 1) короткая зародышевая полоска, которая первоначально состоит только из головных лопастей и зоны роста; позднее благодаря деятельности зоны роста и новообразованию сегментов зародышевая полоска значительно удлиняется; 2) полудлинная зародышевая полоска, в которой помимо головных лопастей и зоны роста содержится материал нескольких передних сегментов; 3) длинная зародышевая полоска, которая не имеет зоны роста и прямо расчленяется на полное количество сегментов. Для *Holometabola* характерна зародышевая полоска длинного типа, и термины «короткая» и «длинная» зародышевая полоска мы используем в ином смысле, а именно для обозначения возрастных изменений в форме зародышевой полоски.

Дифференциация бластодермы на зародышевую полоску и внезародышевую часть начинается в конце первых суток развития. Ранняя (короткая) зародышевая полоска *Pieris* имеет большую протяженность по ширине, нежели по длине; она широким поясом покрывает брюшную и боковые поверхности яйца, а более тонкая внезародышевая бластодерма располагается на переднем и заднем конце и в узкой медианной области на спине (см. рис. 32, в). В это же время начинается формирование эмбриональных оболочек. Этот процесс протекает у *Pieris* своеобразно — без образования типичных амниотических складок (рис. 34). Сначала внезародышевая бластодерма отделяется от зародышевой полоски и нарастает на нее, образуя серозу, одевающую все яйцо непрерывным слоем. Затем из истончающихся краев зародышевой полоски образуется амнион. Эти края загибаются и смыкаются над зародышевой полоской, ограничивая амниотическую полость. Между амнионом и серозой оказывается некоторое количество желтка.

На рис. 35, а изображен сагиттальный разрез через короткую зародышевую полоску. Она состоит из одного слоя довольно высоких призматических клеток, в ядрах которых различаются ядрышки. Зародышевая полоска уже полностью покрыта серозой, которая имеет характер плоского эпителия, состоящего из сильно растянутых клеток. Амнион еще отсутствует. Находящийся внутри зародыша желточный синцитий начинает распадаться на отдельные блоки (желточные клетки), содержащие по одному или несколько ядер (так называемое дробление желтка).

Стадия длинной зародышевой полоски (тотальный препарат). Дальнейшее развитие сопровождается удлинением зародышевой полоски, которое составляет 1-ю фазу бластокинеза. Так как в зародышевой полоске *Pieris* зона роста отсутствует, она удлиняется за счет перераспределения клеточного материала. Зародышевая полоска становится узкой, широким ост

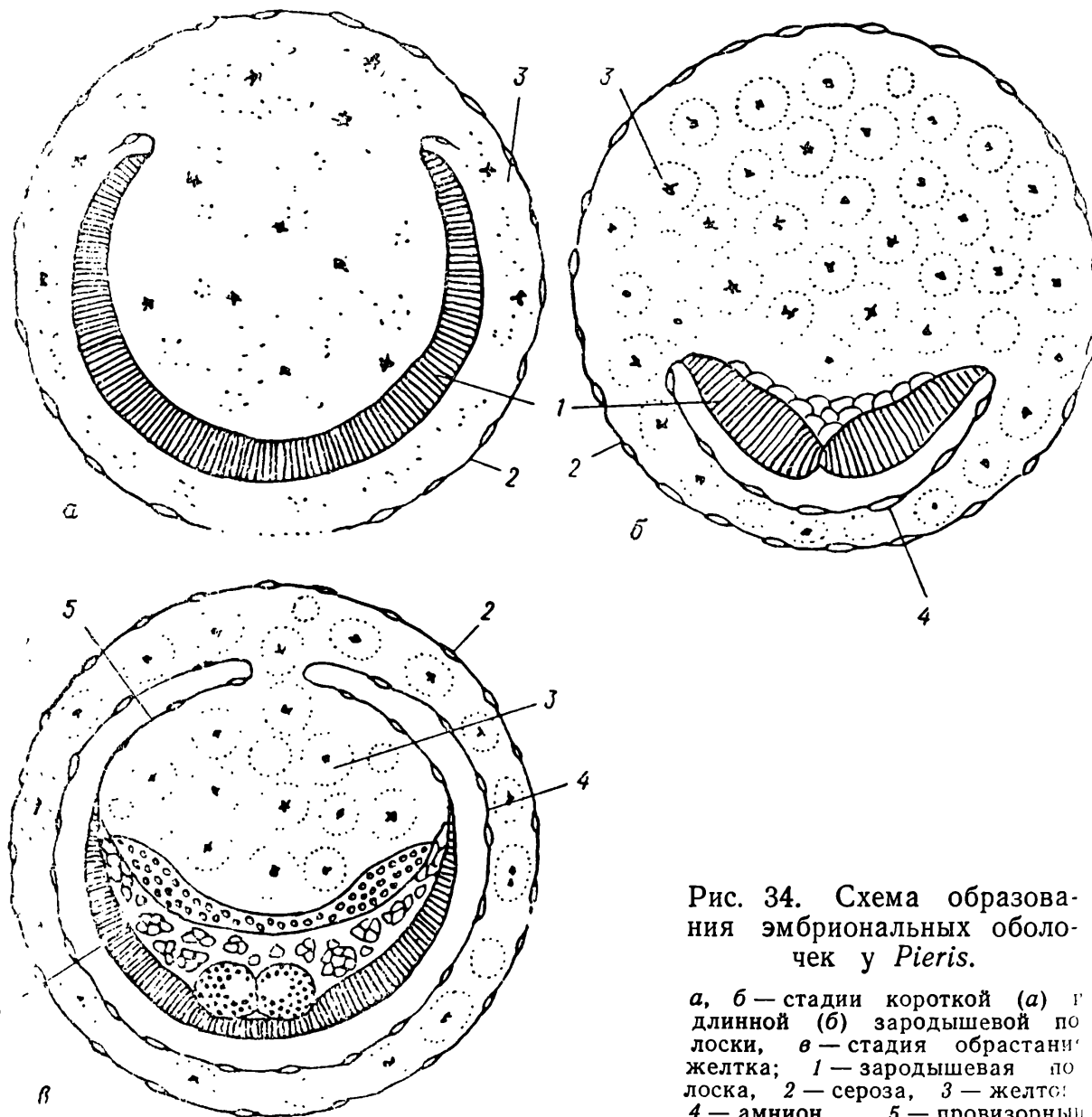


Рис. 34. Схема образования эмбриональных оболочек у *Pieris*.

а, б — стадии короткой (*а*) и длинной (*б*) зародышевой полоски, *в* — стадия обрастания желтка; 1 — зародышевая полоска, 2 — сероза, 3 — желток, 4 — амнион, 5 — провизорный эпителий спины.

ется только передний конец, который образует головные части (зачаток гиподермы передней части головы и церебрального ганглия). В период удлинения зародышевой полоски происходит образование амниона, обособление зародышевых листков, сегментация и закладка конечностей.

На тотальном препарате (см. рис. 30, *а, б*) можно видеть, что сформированная таким образом длинная зародышевая полоска имеет форму ленты, тянущейся вдоль брюшной стороны

яйца. Так как в вытянутом состоянии она теперь не помещается на брюшной стороне яйца, ее передний и задний концы загибаются на спинную сторону и погружаются в желток. Зародышевая полоска уже явственно сегментирована и имеет за-

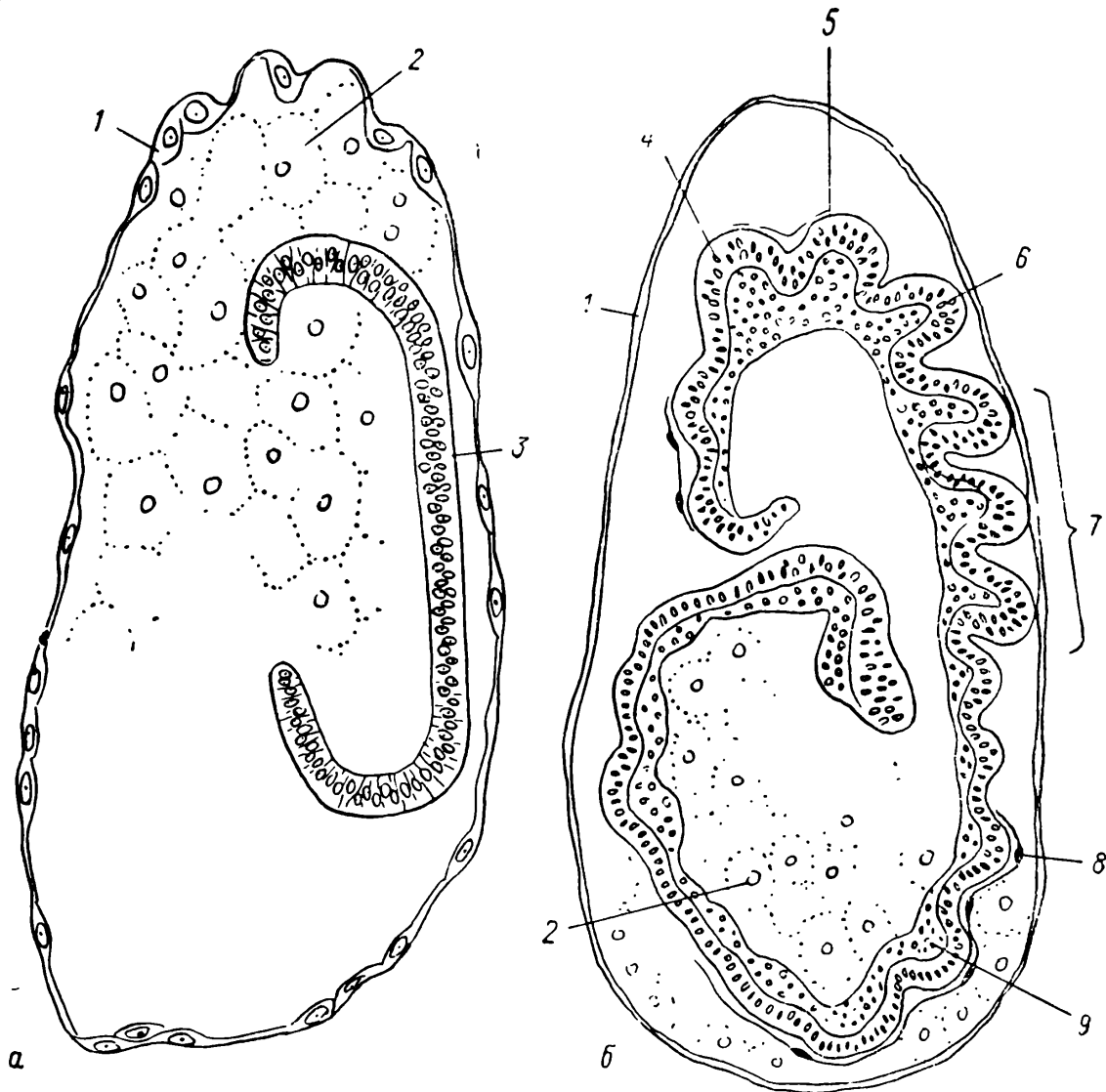


Рис. 35. Стадии короткой (а) и длинной (б) зародышевой полоски у *Pieris brassicae* на сагитальном разрезе. Ув. 3×40 .

1 — сероза, 2 — желточные клетки, 3 — зародышевая полоска, 4 — зачаток мандибулы, 5 — зачаток максиллы, 6 — зачаток нижней губы, 7 — зачатки грудных ног, 8 — амнион, 9 — мезодерма.

чатки следующих конечностей: антенн; очень маленькие, вскоре исчезающие и поэтому обычно остающиеся незамеченными зачатки 2-й пары антенн, мандибулы, максиллы; парный зачаток нижней губы (2-й пары максилл); 3 пары грудных ног и 10 пар брюшных (но у большинства насекомых зачатки брюшных конечностей не образуются). Впереди от антенн располагается раздвоенный зачаток верхней губы, который некоторые авторы расценивают как гомолог конечностей преантеннального сегмента. Из-за изогнутой формы зародышевой полоски видеть все эти зачатки одновременно обычно не удается.

Стадия длинной зародышевой полоски (сагиттальный и поперечный срезы).

Так как при изготовлении продольных срезов очень трудно правильно ориентировать зародыш, то лишь немногие зародыши оказываются порезанными в нужной плоскости. Но если все-таки удастся получить хороший сагиттальный разрез, он будет очень демонстративным (рис. 35, б).

Длинная зародышевая полоска имеет спиральную форму и уже сегментирована. В ней хорошо различаются антеннальный сегмент, 3 челюстных, 3 грудных и 10—11 брюшных сегментов. Амнион уже сформирован, хотя хорошо различается не везде; он имеет строение очень тонкой перепонки, которая лишь местами образует утолщения, содержащие ядра. По всей длине зародышевой полоски хорошо видно, что она состоит из двух клеточных слоев — эктодермы и мезодермы. Эктодерма имеет эпителиальное строение, а мезодермальные клетки располагаются беспорядочно.

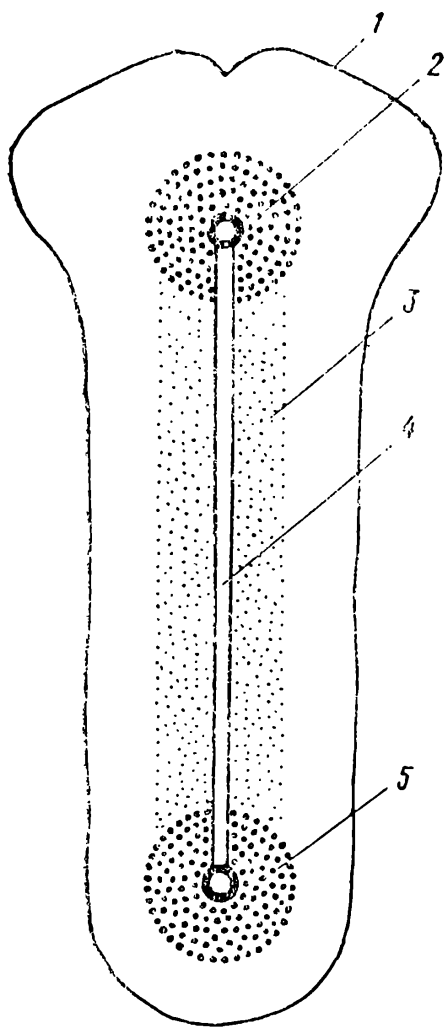


Рис. 36. План расположения материала зародышевых листков в зародышевой полоске насекомых накануне 2-й фазы гаструляции.

1 — головные лопасти, 2 — передний зачаток кишечной энтодермы, 3 — мезодерма, 4 — первичная бороздка, 5 — задний зачаток кишечной энтодермы.

Согласно современным представлениям, гаструляция насекомых имеет характер двухфазного (или даже трехфазного) процесса. Как уже упоминалось, 1-ю фазу гаструляции составляет обособление вителлофагов (желточной энтодермы), которое происходит во время формирования бластодермы; обособление мезодермы и кишечной энтодермы составляет 2-ю фазу гаструляции. Как показано на схематическом рис. 36, материал мезодермы занимает медиальную часть зародышевой полоски, а материал энтодермы располагается биполярно (в области зачатков передней и задней кишки — стомо- и проктодеума); краевые части зародышевой полоски представляют эктодерму.

Мезодерма образуется у *Pieris* путем иммиграции клеток из медиовентральной первичной бороздки, которая тянется по всей длине зародышевой полоски (с обособлением мезодермы удобнее ознакомиться на поперечных срезах). По мере более обильного врастания кле-

точных масс у переднего и заднего конца первичной бороздки образуется кишечная энтодерма (рис. 37, а). На более поздней стадии развития на тех же местах как два эктодермальных впячивания образуются зачатки передней и задней кишки (стомодеум и проктодеум). В момент своего выделения из состава зародышевой бластодермы энто- и мезодерма не отличаются друг от друга.

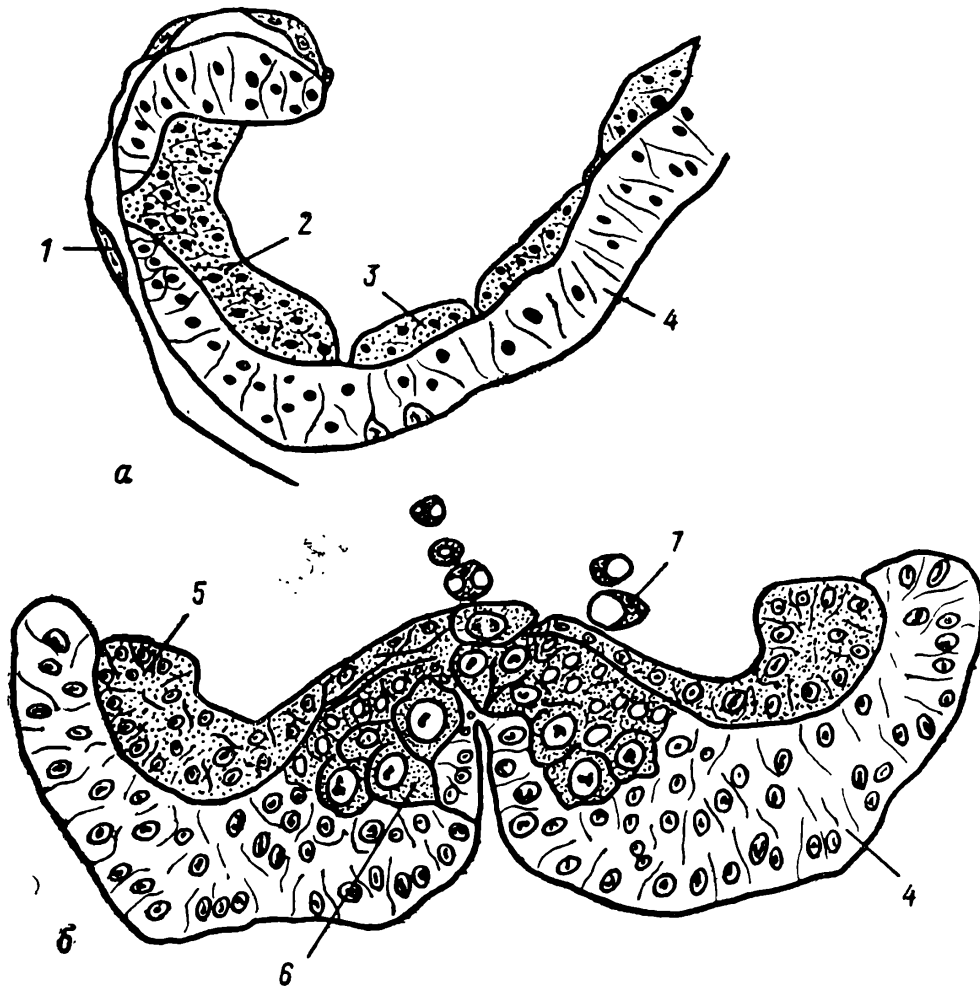


Рис. 37. Образование энтодермы (а) (сагиттальный срез) и формирование сомитов (б) (поперечный срез) у *Pieris rapae* [Eastham, 1927, 1930].

1 — амнион, 2 — передний зачаток энтодермы, 3 — мезодерма, 4 — эктодерма, 5 — сомиты, 6 — нейробласты, 7 — кровяные клетки.

Так как длинная зародышевая полоска спирально изогнута, на каждом поперечном срезе через яйцо она оказывается перерезанной в двух или даже в трех местах (рис. 38). Чтобы составить себе представление об образовании мезодермы, достаточно рассмотреть одно из таких сечений. Проходящая по длине зародышевой полоски первичная бороздка выглядит на поперечном разрезе как небольшая вырезка. В этом месте клетки зародышевой бластодермы утрачивают правильное расположение и погружаются внутрь. Они составляют мезодерму, которая распространяется по внутренней поверхности зароды-

шевой полоски вправо и влево. Оставшиеся на поверхности клетки представляют собой эктодерму.

На поперечном разрезе хорошо видны также амнион, сероза и желточные клетки.

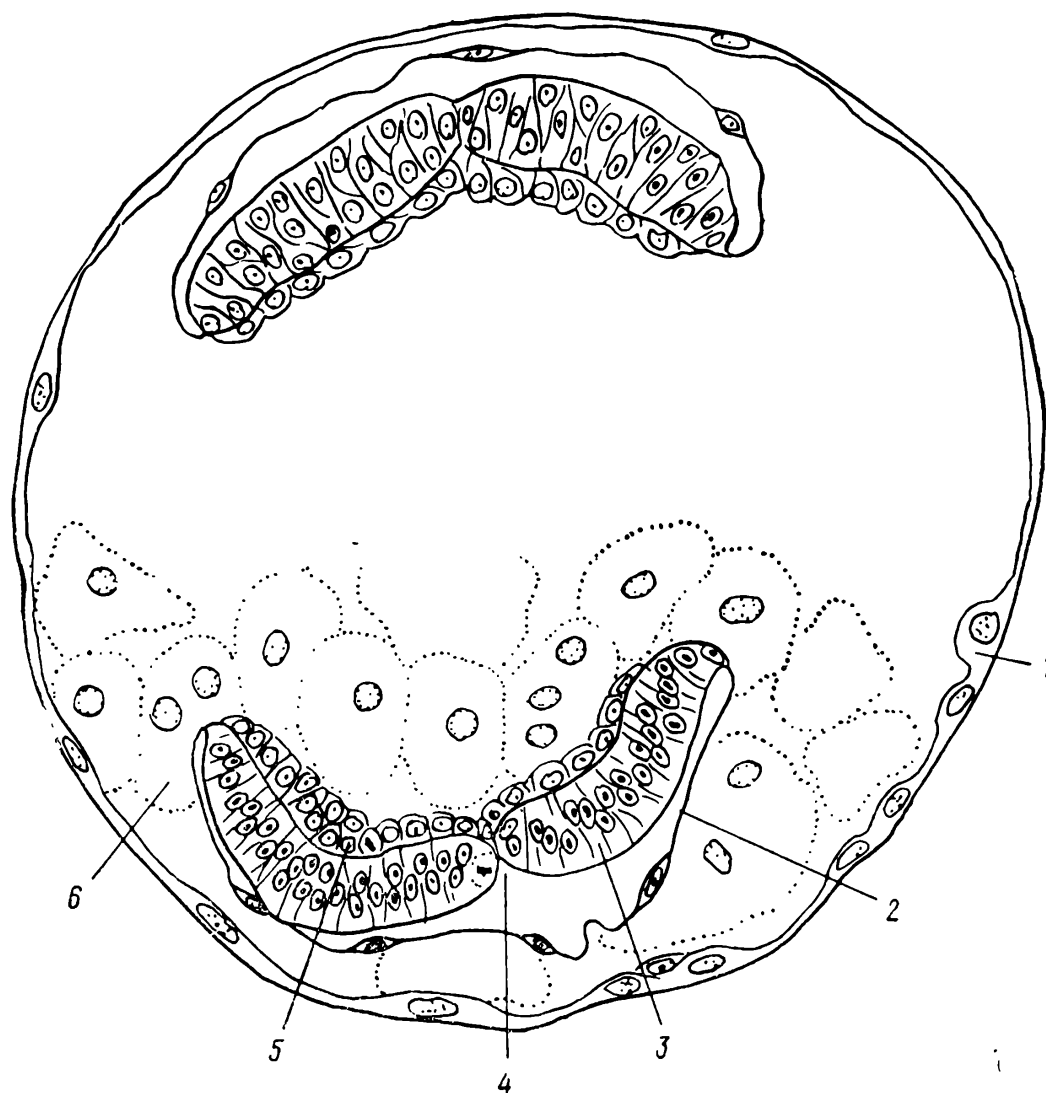


Рис. 38. Поперечный разрез через длинную зародышевую полоску *Pieris brassicae*. Ув. 7×40 .

1 — сероза, 2 — амнион, 3 — зародышевая полоска, 4 — первичная бороздка, 5 — мезодерма, 6 — желточные клетки.

Стадия обрастания желтка (тотальный препарат). После того, как зародышевая полоска достигнет своей максимальной длины, начинается ее укорочение (2-я фаза бластокинеза). В это время она становится значительно шире и на ее поверхности различаются стигмы (на 1-м грудном и восьми передних брюшных сегментах — см. рис. 30, в), что свидетельствует о развитии трахейной системы. Укорочение зародышевой полоски приводит к тому, что она снова целиком умещается на брюшной стороне яйца, а ее передний и задний концы оказываются на соответствующих концах яйца (см. рис. 30, г). Одновременно

но зародышевая полоска растет в ширину, обрастая с боков желточную массу, объем которой начинает сокращаться. Затем боковые края зародышевой полоски сближаются и срастаются друг с другом на спинной стороне. Этот процесс («замыкание спины») начинается на переднем и заднем концах и завершается в области 1-го грудного сегмента. В этом месте некоторое время сохраняется связь зародыша с амнионом и остается отверстие, через которое полость тела зародыша сообщается с пространством между амнионом и серозой.

Стадия обрастания желтка (поперечный срез). Во время укорочения зародышевой полоски и обрастания желтка происходят закладка и формирование различных внутренних органов. Для более подробного ознакомления с процессами органогенеза необходимо очень тщательно изучить несколько серий срезов через зародышей на разных стадиях развития. Но так как это не входит в нашу задачу, то мы рассмотрим только один поперечный разрез через зародыш, достигший минимальной длины.*

После образования зародышевых листков по всей длине зародышевой полоски образуются два утолщения эктодермы — нервные валики. В них происходит расслоение эктодермы на поверхностный чисто кожный слой и более глубокий слой, состоящий из крупных клеток — нейробластов (см. рис. 37, б). Путем своеобразного неравномерного деления от нейробластов «отпочковываются» более мелкие клетки, которые затем становятся ганглиозными клетками брюшной нервной цепочки. Сходным образом из эктодермы головных лопастей обособляются зачатки головного мозга.

Конечности закладываются в форме выпячиваний эктодермы, внутрь которых заходят мезодермальные клетки. Ряд внутренних органов развивается из цилиндрических впячиваний эктодермы. Таким образом, на переднем и заднем конце зародышевой полоски формируются стомодеум и проктодеум, в латеральных частях зародышевой полоски — зачатки трахей, а у основания 2-й пары максилл — зачатки лабиальных желез. Из 6 трубчатых выпячиваний дна проктодеума развиваются мальпигиевы сосуды. Растущие стомо- и проктодеум затапливают внутрь ранее образовавшиеся на том же месте передний и задний зачатки средней кишки. Последние приобретают форму клеточных масс, распространяющихся по всей поверхности желтка двумя латеральными языками. Пара таких языков растет от стомодеума назад, другая пара — от проктодеума вперед. Обе пары языков встречаются и срастаются друг с другом на боках желточной массы, потом они распространяются на

* Все необходимые для понимания этого препарата сведения можно найти в работе Истхэма [Eastham, 1930].

брюшную поверхность желтка, а еще позднее — на спинную. В результате образуется средняя кишка, внутри которой оказывается значительная часть желточных клеток.

В латеральных частях мезодермы образуются метамерные утолщения — сомиты (см. рис. 37, б), в которых путем расхождения клеток возникают целомические полости; медианная часть мезодермального пласта остается тонкой и несегментированной. Позднее стенки сомитов разрушаются, что приводит к образованию смешанной полости тела. За счет мезодермы развивается висцеральная мускулатура, примыкающая к стенке кишечника, мышцы стенки тела и конечностей и жировое тело. Группы мезодермальных клеток, занимающие самое латеральное положение, становятся кардиобластами: после того, как боковые края зародышевой полоски сомкнутся на спине, кардиобласты правой и левой стороны тела сближаются и образуют сердечную трубку. Из медианной несегментированной мезодермы развиваются кровяные клетки. В мезодерме брюшка обособляются две группы клеток — зачатки половых желез.

На рис. 39 изображен поперечный разрез через зародыш на стадии обрастания желтка. На поверхности зародыша виден хорион, который не был удален при изготовлении препарата. Так как хорион образует продольные рубчики, на поперечном разрезе он имеет зубчатые очертания. Под хорионом располагается довольно толстая сероза, затем следует слой крупных желточных клеток и очень тонкий амнион, полностью одевающий зародыш со всех сторон (небольшое отверстие на спине, через которое полость тела зародыша сообщается с пространством между амнионом и серозой, на разрез не попало). Большое количество желточных клеток лежит внутри зародыша. Зародышевая полоска стала очень широкой и толстой. Она примыкает к внутренней массе желтка с брюшной стороны; ее боковые края еще не соединились на спинной стороне. Тем не менее на спинной поверхности внутренней массы желтка различается тонкий слой клеток, напоминающий внезародышевую бластодерму. Происхождение этого провизорного эпителия спины не вполне ясно: он мог образоваться в результате истончения краев зародышевой полоски или за счет амниона (см. рис. 34, в).

Так как разрез прошел приблизительно на уровне 1-го сегмента брюшка, на него попали перерезанные кончики 3-й пары грудных ног. В самом зародыше различается поверхностный слой кожной эктодермы (гиподермы), от которой полностью обособился зачаток брюшной нервной цепочки. В периферической части этого зачатка видна плотная масса ганглиозных клеток (нейробласты уже исчезли), а в центральной — нейропиль, образованный отростками нервных клеток. На поверхности ганглия местами различаются сильно уплощенные клетки соединительнотканной оболочки. На разрезе видны также стиг-

ма — наружное отверстие одной из трахей — и перерезанные слюнные железы.

В тесном контакте с внутренней массой желтка находится кишечная энтодерма. Правый и левый энтодермальные языки уже соединились на брюшной стороне. Энтодермальные клетки

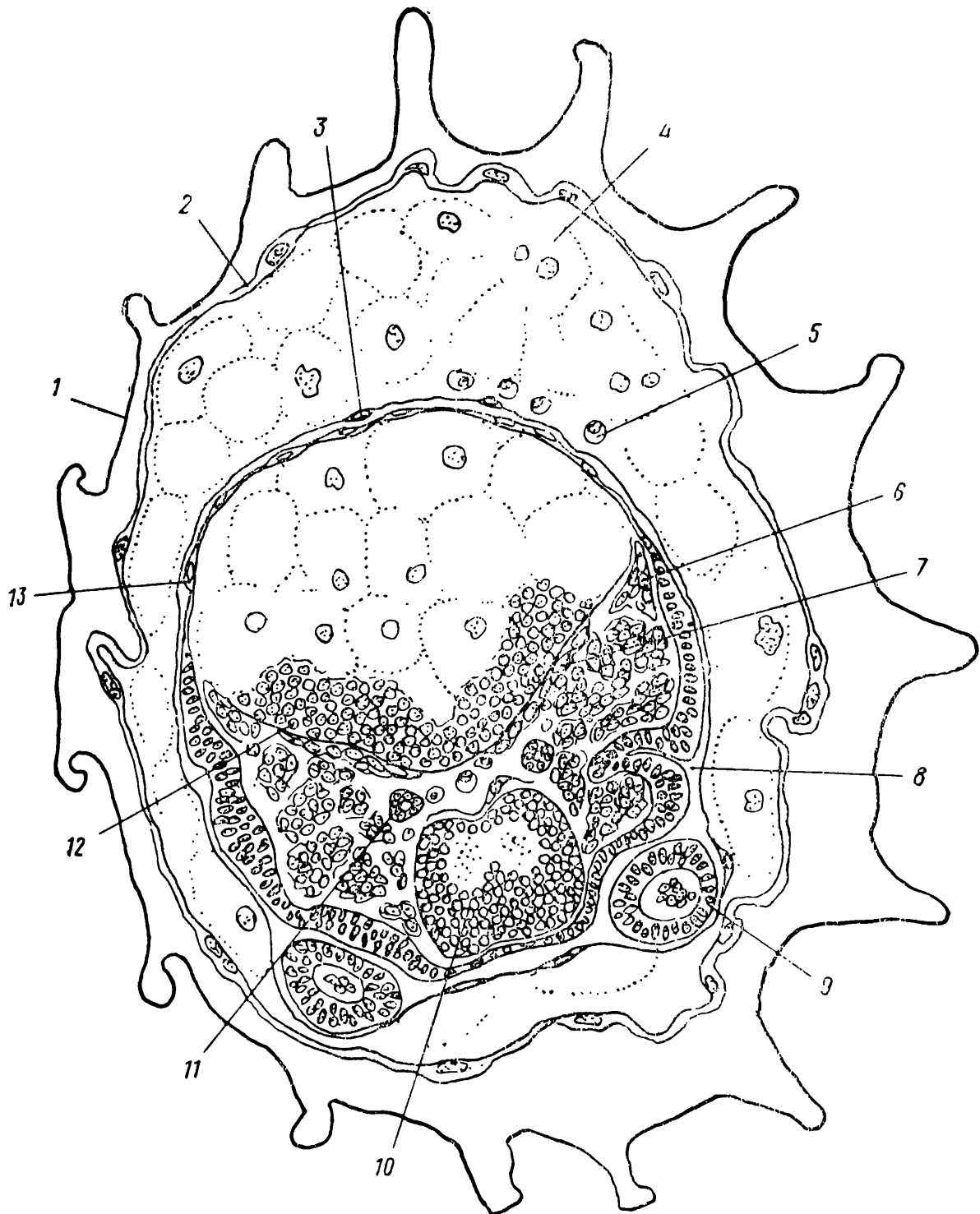


Рис. 39. Поперечный разрез через зародыш *Pieris brassicae* на стадии обра-
стания желтка. Ув. 7×40 .

1 — хорион, 2 — сероза, 3 — амнион, 4 — желточные клетки, 5 — кровяные клетки, 6 — кардиобласты, 7 — мезодерма, 8 — стигма, 9 — конечность, 10 — ганглий брюшной це-
почки, 11 — лабиальная железа, 12 — кишечная энтодерма, 13 — провизорный эпителий
спины.

располагаются в несколько слоев в виде рыхлой массы. К энтодерме справа и слева примыкают две пластинки висцеральной мезодермы. В пространстве между энтодермой и зачатком брюшной нервной цепочки лежат вакуолизированные кровяные клетки; эти клетки встречаются также в промежутке между амнионом и серозой, куда они попадают через спинное отверстие. У боковых краев зародышевой полосы видны треугольные группы кардиобластов. Остальная мезодерма представлена более или менее плотными комплексами клеток, представляющими зачатки мышц и жирового тела. На разрезах, прошедших на иных уровнях, можно видеть зачатки других органов (головного мозга, стомо- и проктодеум, половой зачаток и др.).

Поздний зародыш (тотальный препарат). Еще до полного замыкания спины зародыш снова начинает удлиняться, и его задний конец подгибается на брюшную сторону (см. рис. 30, д, е). Головные и грудные конечности расчленяются и приобретают свою окончательную форму. Брюшные конечности сохраняются только на 3—6- и 10-м сегментах брюшка; они остаются короткими и превращаются в так называемые ложные ножки. Вскормленная таким образом гусеница разрывает хорион, выходит из него и начинает активный образ жизни. Предварительно гусеница съедает ту часть желтка; которая не попала внутрь зародыша при замыкании спины.

2. ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПИЛИЛЬЩИКА *Pontania*

Развитие ивового толстостенного пилильщика (*Pontania capraea*) описано О. М. Ивановой-Казас в 1961 г. Пилильщик откладывает яйца по одному в молодые листочки ивы *Salix fragilis*, чем вызывает развитие характерных галлов. Сначала место откладки яйца выглядит как более темное пятно на поверхности листа, затем вокруг яйца начинается реактивное разрастание тканей, и образуется галл — овальное утолщение листовой пластинки. Самые старые галлы приобретают красноватую окраску. Внутри галла находится заполненная воздухом щелевидная полость, в которой протекает все эмбриональное личиночное развитие пилильщика. Зрелые личинки через прогрызенное в стенке галла отверстие уходят в почву, где плетут темнокоричневые глянцевитые коконы, в которых окукливаются.

В окрестностях Ленинграда откладка яиц продолжается с июня по август. В июле наряду со свежеотложенными яйцами встречаются личинки разных возрастов, а в августе наблюдается вылет нового поколения пилильщиков. Насекомые, не успевшие завершить развитие в данном сезоне, впадают в диапаузу и зимуют на стадии куколки.

Сбор галлов с развивающимися в них пилильщиками не со

ставляет труда. Ранние стадии развития следует искать в самых молодых, расположенных на концах ветвей листьях. Яйца пилильщика достаточно крупны и хорошо видны простым глазом, но на начальных стадиях развития они очень нежны. Поэтому извлекать их из самых маленьких галлов нужно с помощью препаровальных игл под бинокулярной лупой. Более старые галлы можно вскрывать бритвой без помощи оптики, так как яйца вследствие всасывания воды несколько увеличиваются в объеме и становятся более упругими. Яйца, извлеченные из галлов, нужно сперва собирать в чашечку с водой, а затем, когда их наберется 20-30 штук, зафиксировать все вместе. В каждой партии яиц окажутся зародыши на разных стадиях развития.

С изменениями внешней формы зародыша можно познакомиться путем прижизненных наблюдений и по тотальным препаратам.

Яйца *Pontania* одеты тонким прозрачным хорионом и желточной оболочкой. Извлеченные из галлов и помещенные в чашечку с водой яйца продолжают развитие, что дает возможность проследить эмбриональное развитие до конца. При температуре 20-24°C оно продолжается 8-10 дней. Яйца имеют удлиненную форму (рис. 40), передний конец несколько уже заднего, брюшная сторона выпуклая, спинная — слабо вогнутая.

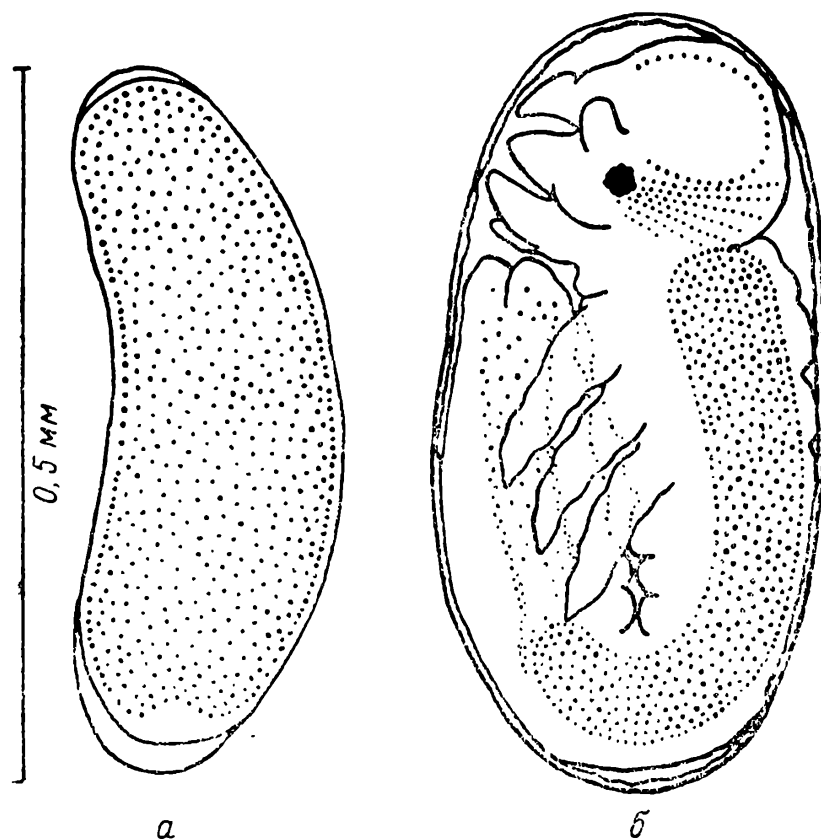


Рис. 40. Внешний вид живых зародышей *Pontania carpeae* [Иванова-Казас, 1961].

— стадия бластодермы, б — тот же зародыш через 6 дней.

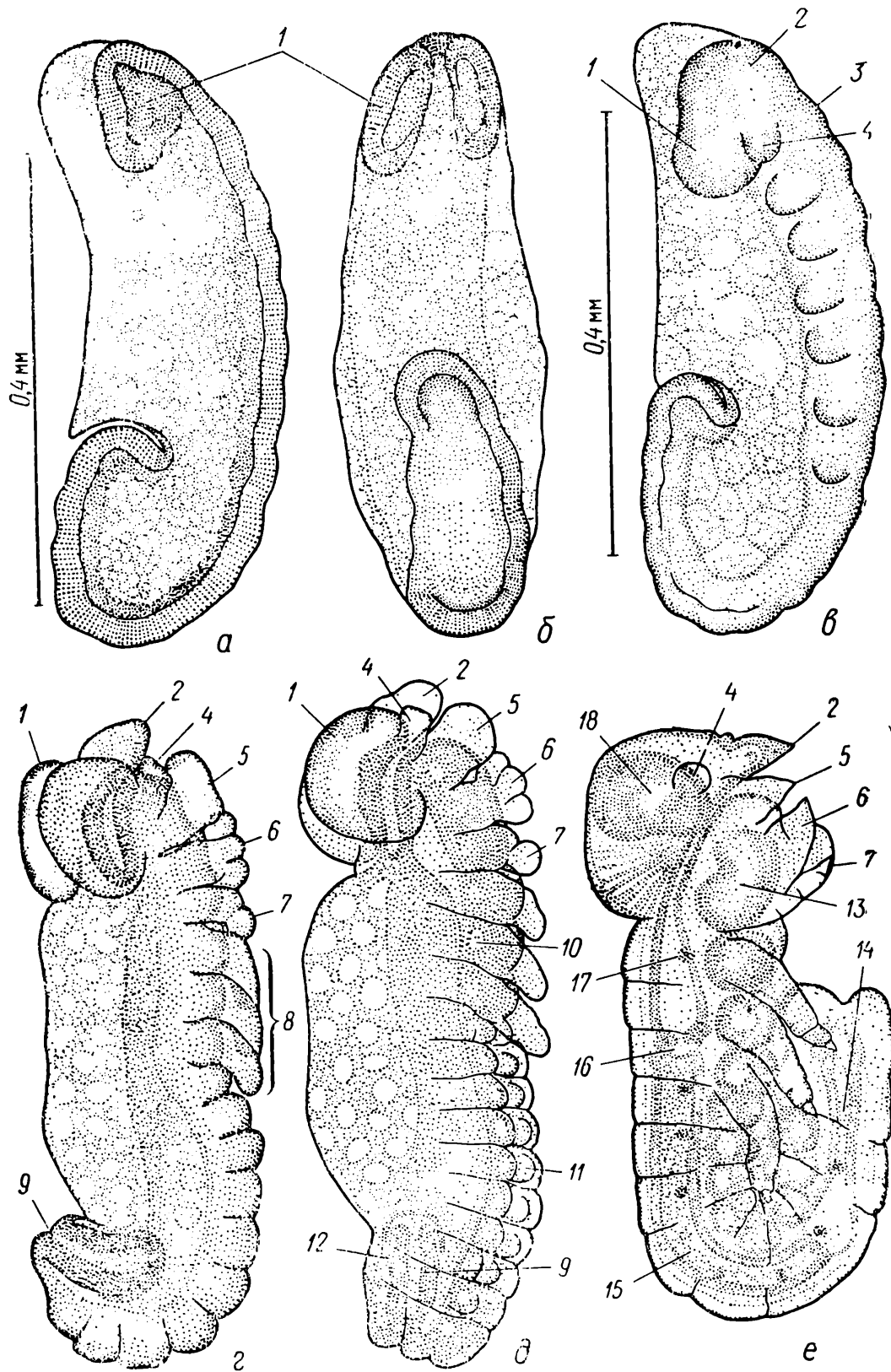


Рис. 41. Изменения внешней формы зародыша *Pontania* по тотальным паратам [Иванова-Казас, 1961].

а, б — стадии длинной зародышевой полоски сбоку (а) и со спинной стороны (б); в — более поздняя стадия с зачатками конечностей, г — зародышевая полоска в конце периода укорочения, д — зародыш на стадии обрастания желтка, е — поздний зародыш перед вылуплением из яйца; 1 — головные лопасти, 2 — верхняя губа, 3 — интестинальный сегмент, 4 — зачаток антенны, 5 — зачаток мандибулы, 6 — зачаток максиллы, 7 — зачаток нижней губы, 8 — грудные конечности, 9 — проктодеум, 10 — брюшная цепочка, 11 — брюшные конечности, 12 — мальпигиевы сосуды, 13 — подглоточный ганглий, 14 — задняя кишка, 15 — средняя кишка, 16 — провентрикулус, 17 — стигмы, 18 — головной мозг.

Длина яйца в начале развития составляет приблизительно 0,5 мм; позднее яйца несколько увеличиваются (особенно в ширину). На концах яйца между поверхностью зародыша и оболочками имеется небольшое перивителлиновое пространство. На живых яйцах желток выглядит как сероватая зернистая масса, а бластодерма имеет вид прозрачного поверхностного слоя. Светлыми и прозрачными остаются ткани зародыша и на более поздних стадиях. Все стадии, описанные ниже по тотальным препаратам (рис. 41), можно наблюдать и прижизненно.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Стадия бластодермы (поперечный разрез). Так как стадии дробления протекают у *Pontania* очень быстро, они редко попадают при сборе материала. Поэтому мы начнем изучение развития *Pontania* со стадии бластодермы. Поперечный разрез через зародыш имеет округлые очертания (рис. 42, а). На по-

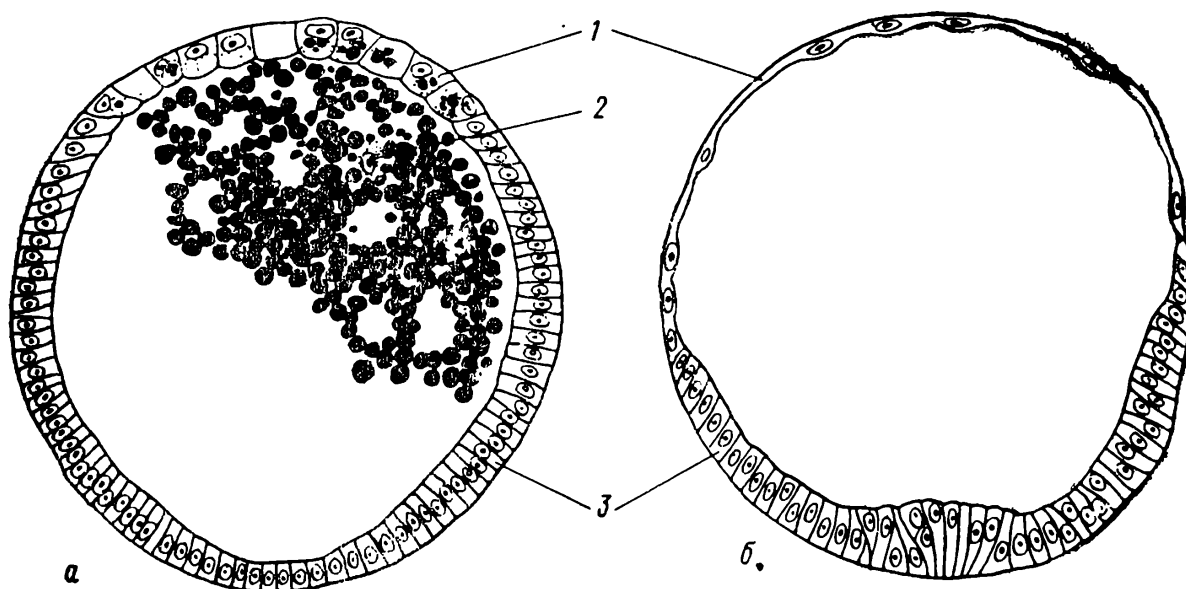


Рис. 42. Поперечные разрезы через зародыш *Pontania* на стадиях бластодермы (а) и короткой зародышевой полоски (б) [Иванова-Казас, 1961]. Ув. 10×40.

1 — внезародышевая бластодерма, 2 — вителлофаги, 3 — зародышевая бластодерма (полоска); хорион не изображен, желток изображен частично.

верхности различается бластодерма, состоящая из одного слоя клеток с ясными клеточными границами, а в середине — масса желтка. При окраске железным гематоксилином гранулы желтка сильно чернятся. Между ними видны пустоты, оставшиеся на месте растворившихся при обработке капелек жира. Находящиеся в желтке вителлофаги окрашиваются слабо и различимы только при очень внимательном рассмотрении препарата.

В бластодерме *Pontania* рано обозначаются зародышевая и внезародышевая части. Зародышевая бластодерма сначала покрывает большую часть яйца и состоит из узких призматических клеток, не содержащих желточных включений. Внезародышевая бластодерма имеет меньшую протяженность и покрывает зародыш только со спинной стороны. Она состоит из кубических клеток, содержащих вакуоли и отдельные гранулы желтка.

Стадия короткой зародышевой полоски (сагиттальный и поперечный срезы). Концентрация клеток зародышевой бласто-

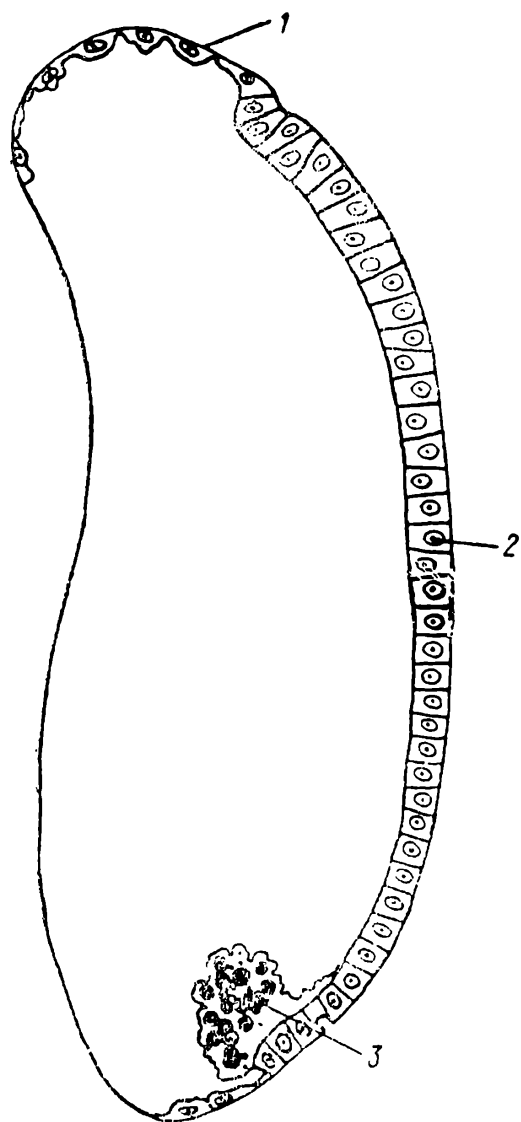


Рис. 43. Короткая зародышевая полоска *Pontania* (сагиттальный разрез [Иванова-Казас, 1961]. Ув. 7×10.

1 — внезародышевая бластодерма, 2 — зародышевая полоска, 3 — половой зачаток.

дермы на брюшной стороне приводит к образованию зародышевой полоски. В то же время зародышевая бластодерма сильно растягивается и принимает вид тонкой мембраны с редко разбросанными ядрами. На сагиттальном разрезе можно видеть, что зародышевая полоска покрывает почти всю выпуклую брюшную поверхность желтка (рис. 43). Она состоит из одного слоя довольно высоких клеток, ядра которых располагаются на разных уровнях. У заднего конца зародышевой полоски различается группа клеток с неясными границами, частично погруженная в желток. Это половой зачаток, обособление которого происходит у пилильщиков на стадии бластодермы. Так как клетки полового зачатка делятся медленнее, чем клетки бластодермы, их ядра отличаются более крупными размерами.

Поперечные срезы, проведенные на разных уровнях, несколько отличаются друг от друга. На переднем конце зародышевая полоска более толстая (здесь впоследствии образуются головные лопасти)

и уже намечаются амниотические складки; в средней части переход от зародышевой полоски к внезародышевой бластоде-

ме более плавный (рис. 42, б), а у заднего конца можно видеть половой зачаток.

Стадия длинной зародышевой полоски (тотальный препарат).

Первоначально зародышевая полоска целиком помещается на брюшной стороне яйца, а потом она начинает удлиняться, так что ее задний конец загибается на спинную сторону яйца (1-я фаза бластокинеза). Специальной зоны роста в зародышевой полоске *Pontania* нет, и ее удлинение происходит благодаря равномерному росту по всей длине или путем перераспре-

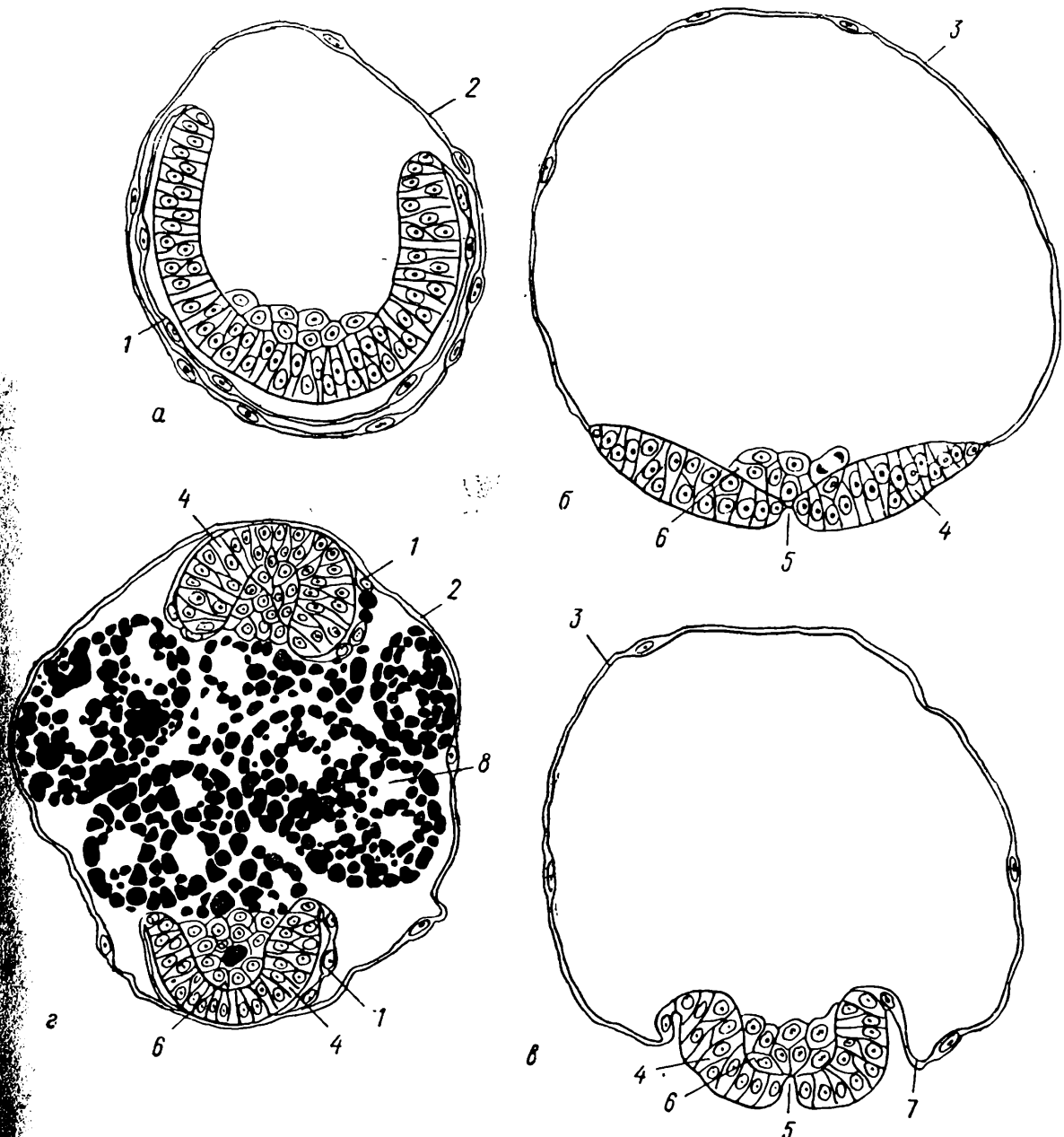


Рис. 44. Поперечные срезы через зародышевую полоску *Pontania* в период ее удлинения (а—в) и длинная зародышевая полоска (г) [Иванова-Казас, 1961]. Ув. 40×10.

1 — амнион, 2 — сероза, 3 — внезародышевая бластодерма, 4 — зародышевая полоска, 5 — первичная бороздка, 6 — мезодерма, 7 — амниотическая складка, 8 — желточные клетки.

деления клеток. На тотальных препаратах (рис. 41) зародышевая полоска отличается от других частей яйца более интенсивной окраской. Спереди она расширена и образует две головные лопасти, а задний конец заходит на спинную сторону. В это время уже имеются слабые признаки сегментации. К концу этой стадии (рис. 41, в) сегментация становится более отчетливой и появляются зачатки конечностей: антенн, мандибул, максилл,

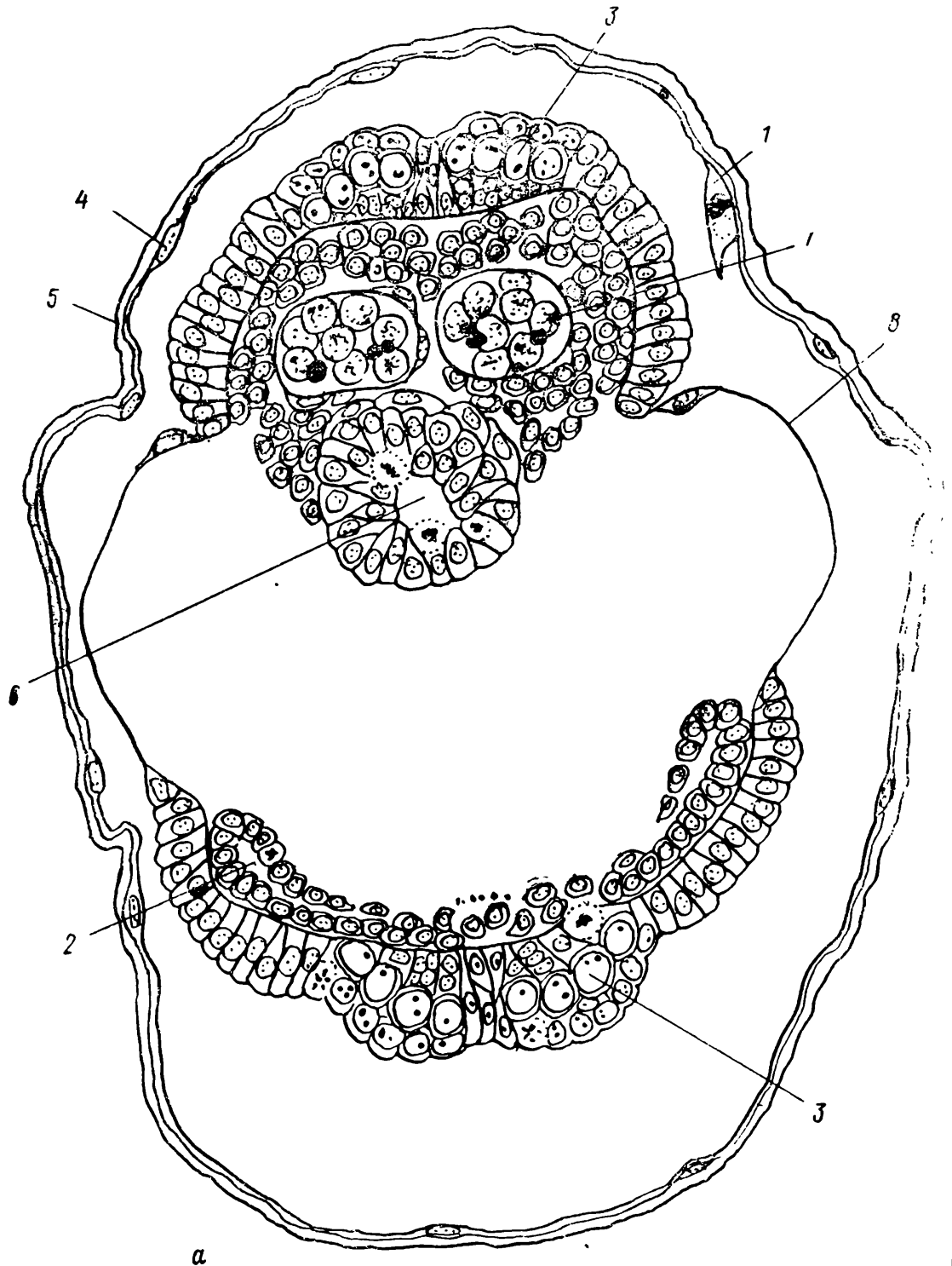
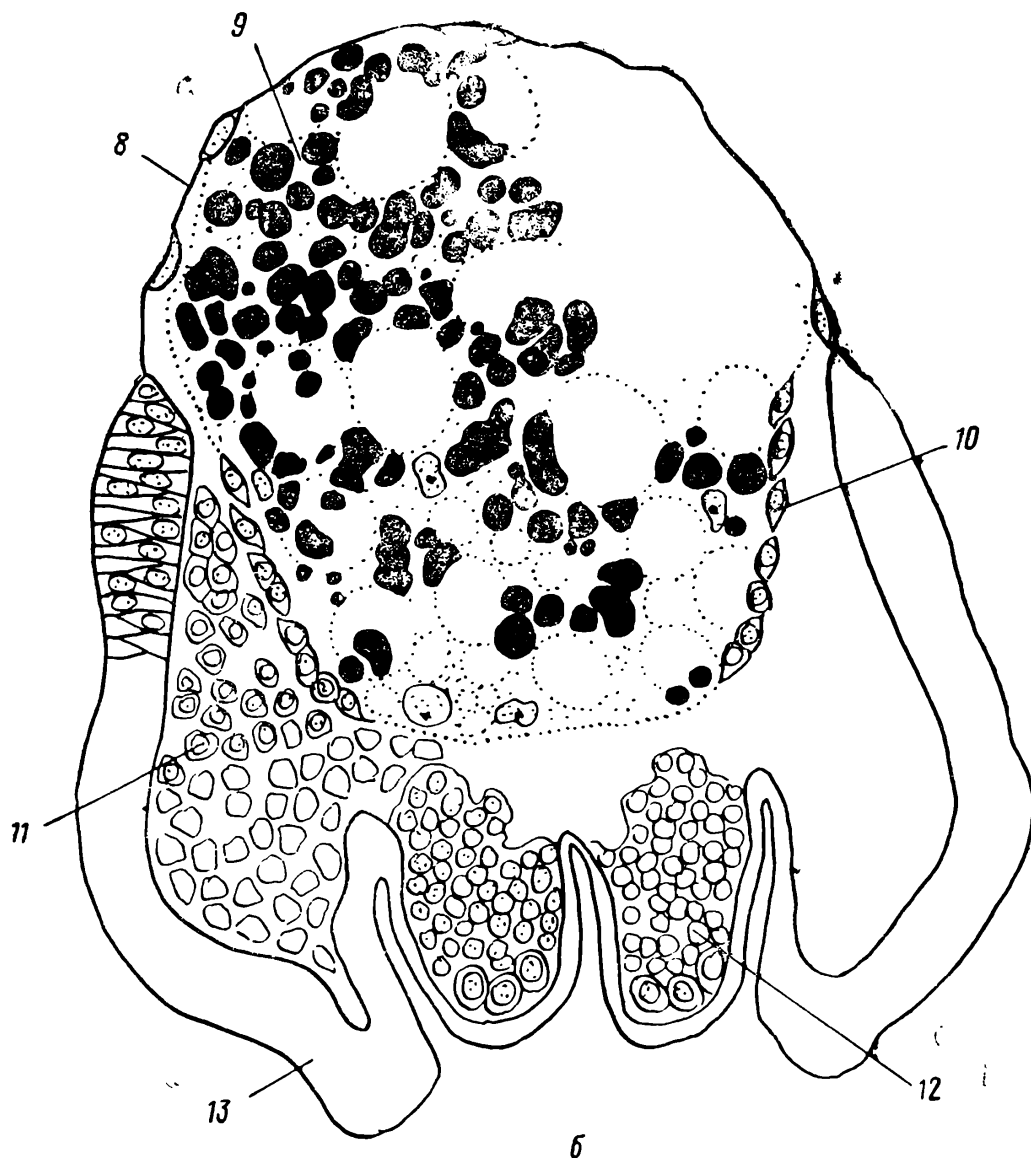


Рис. 45. Зародышевая полоска *Pontania* в период ее укорочения (а) и 1 — остаток амниона, 2 — целомическая полость, 3 — нейробласты, 4 — сероза, 5 — эпителий спины, 9 — желточный синцитий, 10 — кишечная энтодерма, 11 — мезодерма.

нижней губы и трех пар грудных ног (зачатки антенн II у *Pontania* не образуются, но имеется соответствующий им интеркалярный сегмент). Масса желтка, которая на ранних стадиях имеет синцитиальное строение, теперь разделяется на крупные, перегруженные желтком клетки. На этой стадии происходит образование эмбриональных оболочек, но на тотальных препаратах они различаются плохо.

Поперечные срезы через длинную зародышевую полосу. На стадии длинной зародышевой полосы обособляются мезодерма и эмбриональные оболочки. Последние формируются у *Pontania* типичным способом — с образованием амниотических складок. Так как этот процесс начинается на концах зародыша и постепенно распространяется к середине, то на срезах через среднюю часть зародыша амниотические складки отсутствуют или выражены слабо (рис. 44, б, в). Из внутреннего листка складок развивается амнион, из наружного — сероза. На переднем и заднем концах зародышевой полосы ам-



стадии обрастания желтка (б) [Иванова-Казас, 1961]. Ув. 5×90.

серозная кутикула, 6 — проктодеум, 7 — зачатки половых желез, 8 — провизорный
12 — ганглий брюшной цепочки, 13 — зачаток конечности.

ниотические складки уже сомкнулись, и формирование эмбриональных оболочек закончилось (рис. 44, а). А так как задний конец зародышевой полоски заходит на спинную сторону яйца, то на некоторых срезах она оказывается перерезанной дважды (рис. 44, з).

На всех поперечных разрезах на этой стадии можно видеть обособление мезодермы, которое происходит (как у *Pieris*) после иммиграции клеток из медиовентральной первичной бороздки. В то время, как сохраняющие поверхностное расположение клетки (будущая эктодерма) сохраняют эпителиальное расположение, ушедшие внутрь клетки мезодермы располагаются беспорядочно. На рассматриваемой стадии кишечная энтодерма еще отсутствует; она образуется позднее путем выселения клеток со дна стомо- и проктодеума. Таким образом, у *Pontania* гастрюляция протекает как трехфазный процесс: во время 1-й фазы образуются вителлофаги (желточная энтодерма), во время 2-й фазы — мезодерма, а во время 3-й фазы — кишечная энтодерма.

На срезах через зародыш на описываемой стадии можно также видеть, что желточная масса разделилась на отдельные желточные клетки.

Зародышевая полоска в период ее укорочения (поперечный срез). На этой стадии развития начинаются интенсивные процессы органогенеза. Как при изучении развития *Pieris* (см. выше), мы рассмотрим лишь один срез, прошедший близ заднего конца (рис. 45, а). В это время задний конец зародышевой полоски все еще занимает дорсальное положение. По всей длине зародышевой полоски видны нервные валики. На срезах в них хорошо различаются крупные нейробласты, от которых внутрь отделяются ряды более мелких будущих ганглиозных клеток.

Мезодерма уже распространилась по внутренней поверхности зародышевой полоски во всю ее ширину. В латеральных частях мезодермального пласта различаются целомические полости, которые существуют очень недолго. В задней части зародышевой полоски можно видеть перерезанный поперек проктодеум; он (так же, как и стомодеум) образуется как цилиндрическое впячивание эктодермы. Между проктодеумом и поверхностной эктодермой в мезодерме находятся две группы крупных клеток с пузырьвидными ядрами, одетые оболочкой из сильно уплощенных клеток. Это зачатки половых желез, которые получились разделением непарного полового зачатка на две части и образованием вокруг них соединительнотканной оболочки.

Во время укорочения зародышевой полоски амнион разрушается. За счет его остатков образуется тонкая перепонка, по-

крывающая поверхность желтка (так называемая дорсальная мембрана, или провизорный эпителий спины). На рассматриваемом срезе видны боковые части этой мембраны. От амниона происходят также отдельные клетки, свободно лежащие под серозой. Последняя хорошо выражена (она сохраняется до конца эмбрионального развития) и выделяет на своей поверхности слой кутикулы.

Стадия обрастания желтка (тотальный препарат). Укорочение зародышевой полоски завершается тем, что ее каудальный конец снова оказывается на заднем конце яйца (см. рис. 41, д). Боковые края зародышевой полоски начинают обрастать желток с боков, что приводит к замыканию спины. Масса желтка значительно сокращается, она занимает среднюю часть зародыша и не заходит в передний и задний концы. На тотальном препарате видно, что придатки головы приближаются к своей окончательной форме, а грудные конечности значительно удлиняются и расчленяются. Кроме того, на брюшных сегментах появляется 9 пар зачаточных конечностей, 6 из которых (на 2—7 сегментах брюшка) становятся впоследствии ложными ножками личинки. Внутри просвечивают зачатки головного мозга, брюшной нервной цепочки, передней и задней кишки.

Стадия обрастания желтка (поперечный срез). На поперечном разрезе через среднюю часть зародыша (рис. 45, б) можно видеть, что боковые края зародышевой полоски еще не сомкнулись на спинной стороне, но на поверхности желтка различается тонкий провизорный эпителий спины. Желточные клетки снова слились и образуют синцитий, но количество желточных гранул сильно уменьшилось вследствие их рассасывания, и хорошо различаются желточные ядра, которые раньше не были видны. Из-за разрушения стенок целомических мешков мезодерма приобрела характер рыхлой беспорядочной массы клеток, которая заходит в зачатки конечностей. Ганглии брюшной нервной цепочки уже полностью отделились от кожной эктодермы, но в них еще различаются нейробласты. Энтодермальный зачаток представлен двумя пластинками клеток, которые примыкают к желточному синцитию с боков.

Как и у *Pieris* (см. выше), энтодерма распространяется по поверхности желтка двумя лентами, растущими от стомодеума назад, и двумя такими же лентами, растущими от проктодеума вперед. Впоследствии обе пары энтодермальных лент соединяются на боках, а затем разрастаются в дорсальном и вентральном направлениях, пока не оденут массу желтка непрерывным эпителием. В результате весь желток оказывается заключенным внутри средней кишки.

Стадия позднего зародыша (тотальный препарат). Еще до полного замыкания спины зародыш снова начинает вытягиваться, а его задний конец подгибается на брюшную сторону

(см. рис. 41, е). На этой стадии завершаются процессы органогенеза. На тотальном препарате в виде небольших уплотнений гиподермы различимы 10 пар стигм, а внутри зародыша просвечивают кишечный канал, состоящий из передней, средней и задней кишки, и нервная система. Вскоре после достижения этой стадии происходит вылупление личинки.

3. ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

У насекомых с неполным превращением (Hemimetabola) процессы постэмбрионального развития имеют плавный, посте-

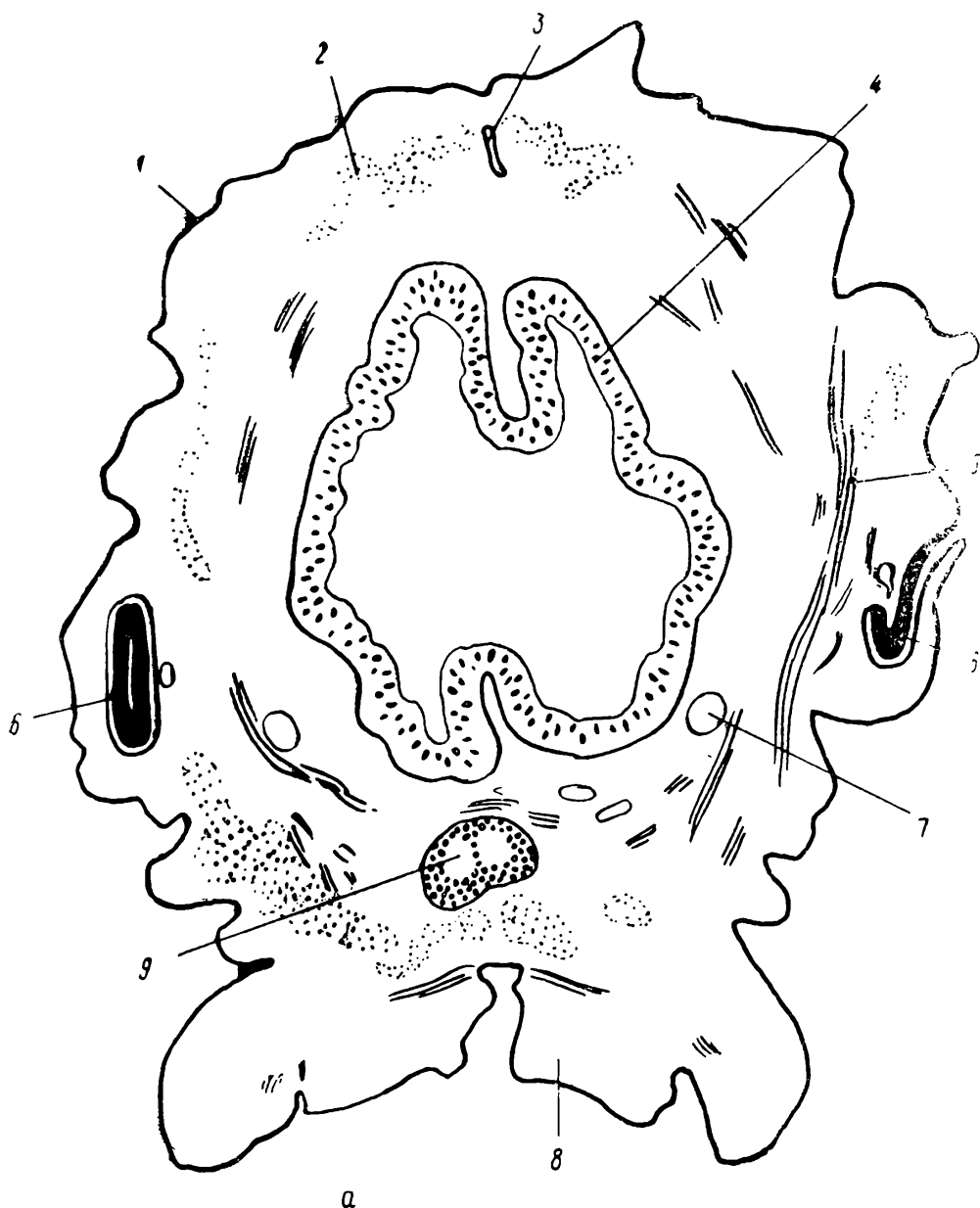


Рис. 46. Имагинальные диски

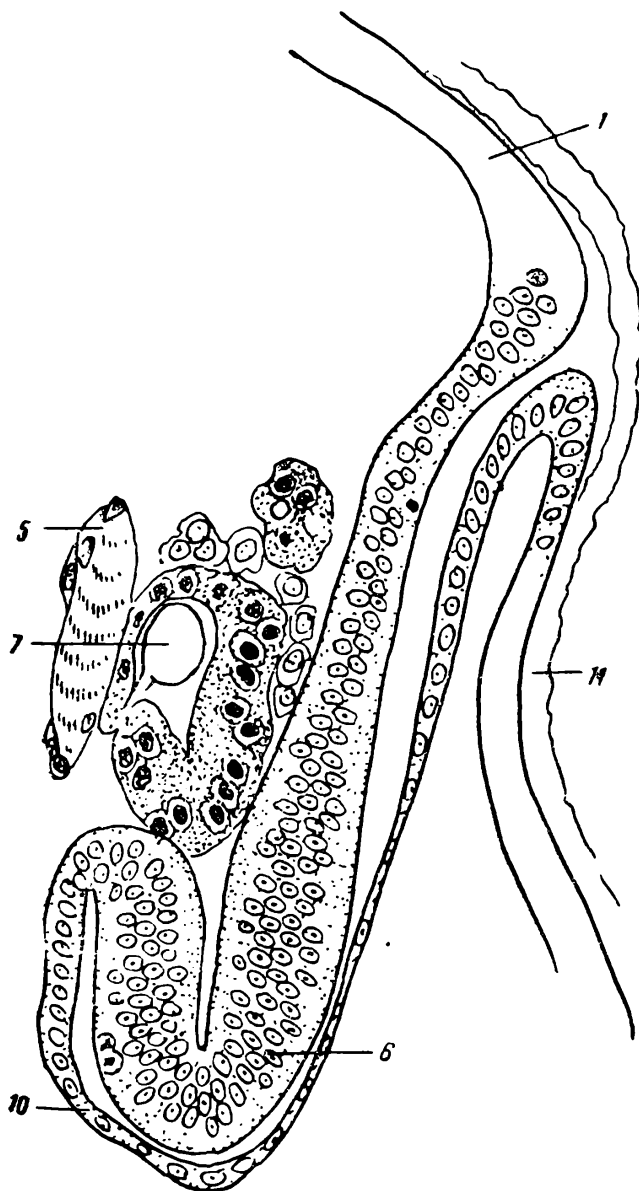
а — поперечный разрез через грудной отдел гусеницы III возраста.
1 — гиподерма, 2 — жировое тело, 3 — сердце, 4 — средняя кишка,
5 — мальпигиевы канальцы, 6 — слюнная железа, 7 — трахейный ствол, 8 — основание ноги, 9 — брюшная нервная цепочка.

ный характер, а при полном превращении (у Holometabola) во время метаморфоза происходит быстрое развитие органов, отсутствующих у личинки (крыльев, половых придатков, сложных глаз и т. д.), и более или менее глубокое обновление многих внутренних органов. Все эти процессы совершаются в основном на стадии куколки, но подготавливаются у личинок поздних возрастов. Представление о них дают гистологические препараты из зачатков крыльев и средней кишки личинки.

Поперечный разрез через имагинальный диск крыла *Pieris*. У личинок насекомых с полным превращением видимых снаружи зачатков крыльев нет, но они представлены в скрытом виде в форме имагинальных дисков, которые располагаются в

латеральных частях 2-го и 3-го сегментов груди дорсальнее основания ног. Первоначально имагинальный диск представляет собой маленькое и незаметное утолщение гиподермы, состоящее из интенсивно размножающихся недифференцированных клеток. Позднее диск значительно разрастается и погружается внутрь, почему и неразличим снаружи. Утолщенное дно этого впячивания представляет собственно зачаток крыла, а остальные более тонкие стенки образуют так называемую периподальную мембрану.

У гусениц *Pieris* III возраста имагинальные диски крыльев достигают уже значительных размеров. Их нетрудно обнаружить при просмотре серии срезов при малом увеличении микроскопа, так как они отличаются от личиночных тканей интенсивной базофилией



б

крыльев у *Pieris brassicae*.

(ув. 7×8), б — имагинальный диск (ув. 40×7);
б — мышцы, б — имагинальные диски крыльев,
ка, 10 — периподальная мембрана, 11 — кутикула.

(рис. 46, а). Дальнейшее изучение препарата нужно производить при большом увеличении. Зачаток крыла имеет форму двуслойной пластинки (складки утолщенной гиподермы), которая вдается в полость периподального мешка; свободный край этой складки обращен к брюшной стороне и назад. Периподальный мешок открывается наружу в своей передне-спинной части узким отверстием, которое различается только на 3—4 срезах. Именно такой срез нужно выбрать для более внимательного рассмотрения и зарисовки.

Эпителий, образующий зачаток крыла, состоит из очень высоких клеток, тесно прижимающихся друг к другу, ядра которых лежат на разных уровнях (рис. 46, б). Некоторые из этих клеток находятся в состоянии митотического деления. Кути-

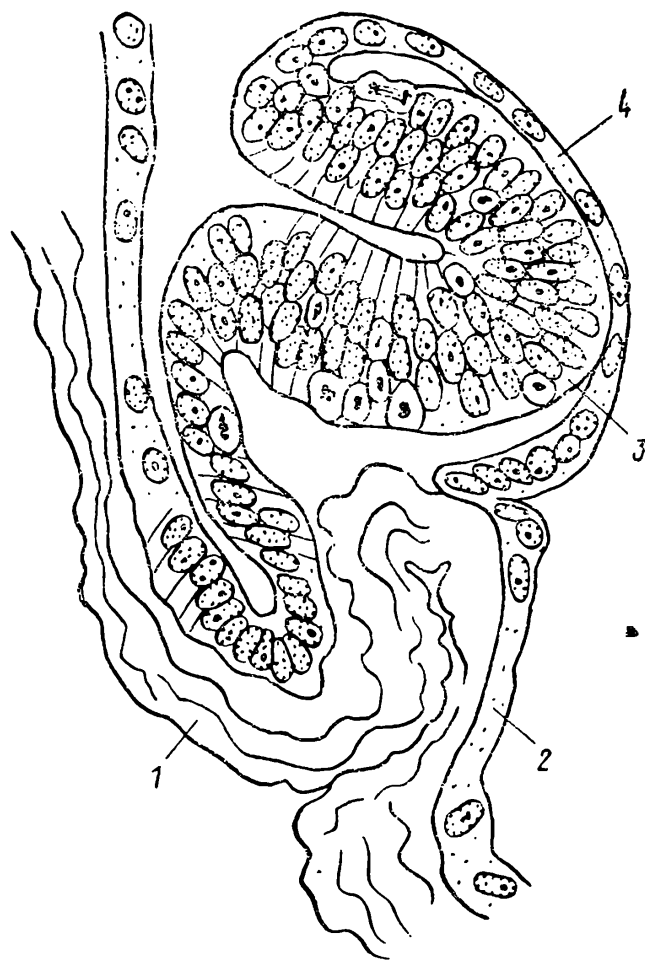


Рис. 47. Имагинальный диск крыла личинки *Pontania* V возраста на разрезе [Иванова-Казас и Иванова, 1964].

1 — кутикула, 2 — гиподерма, 3 — зачаток крыла, 4 — периподальная мембрана.

тонкой пластинки, которая образует под куколочной кутикулой многочисленные складки. Только после вылета взрослой бабочки крылья расправляются и завершают свое развитие.*

* Более подробно описание развития крыла у другой бабочки — меловой огневки (*Ephesia kuhniella*) — дано Келером [Köhler, 1932].

кула, покрывающая тело гусеницы снаружи, в полость периподального мешка не заходит, так как клетки зачатка крыла и периподальной мембраны находятся в недифференцированном состоянии и кутикулу не секретируют. Со стороны полости тела мимо зачатка крыла проходит крупный трахейный ствол, клеточный матрикс которого утолщен и состоит из гипертрофированных клеток. У гусениц более поздних возрастов на этом стволе образуются ответвления, врастающие в крыловую зачатку.

Во время линьки на куколку отверстие периподального мешка расширяется, и зачаток крыла выходит наружу. Клетки, составляющие этот зачаток, из высоко-призматических становятся уплощенными, растянутыми в ширину. Поэтому крыловой зачаток приобретает форму очень

Имагинальный диск крыла *Pontania* (поперечный разрез). Все сказанное выше о развитии крыльев у *Pieris* в общей форме относится и к *Pontania*. На рис. 47 изображен имагинальный диск крыла личинки *Pontania* V возраста. Он значительно меньших размеров, чем у *Pieris*, но в нем различаются те же части: утолщенный зачаток крыла, в эпителии которого видны многочисленные митозы, и более тонкая периподальная мембрана; кутикула, выделяемая личиночной гиподермой, в полость периподального мешка не заходит.*

Поперечный разрез через стенку средней кишки. При метаморфозе *Holometabola* нередко происходят глубокие перестройки внутренних органов. Клетки многих личиночных тканей рано утрачивают способность делиться и рост этих тканей происходит за счет увеличения размеров клеток, что часто сопровождается полиплоидией. На стадии куколки личиночные ткани дегенерируют, а сам личиночный орган разрушается; затем он восстанавливается за счет специальных имагинальных клеток, которые с самого начала содержатся в нем в скрытом виде. Имагинальные клетки размножаются митотическим путем и остаются мелкими до конца метаморфоза.

У гусениц *Pieris* III возраста в эпителии средней кишки личиночные и имагинальные клетки различаются довольно хорошо, но изучение препарата лучше производить с помощью иммерсионного объектива. Стенки кишки состоят из крупных

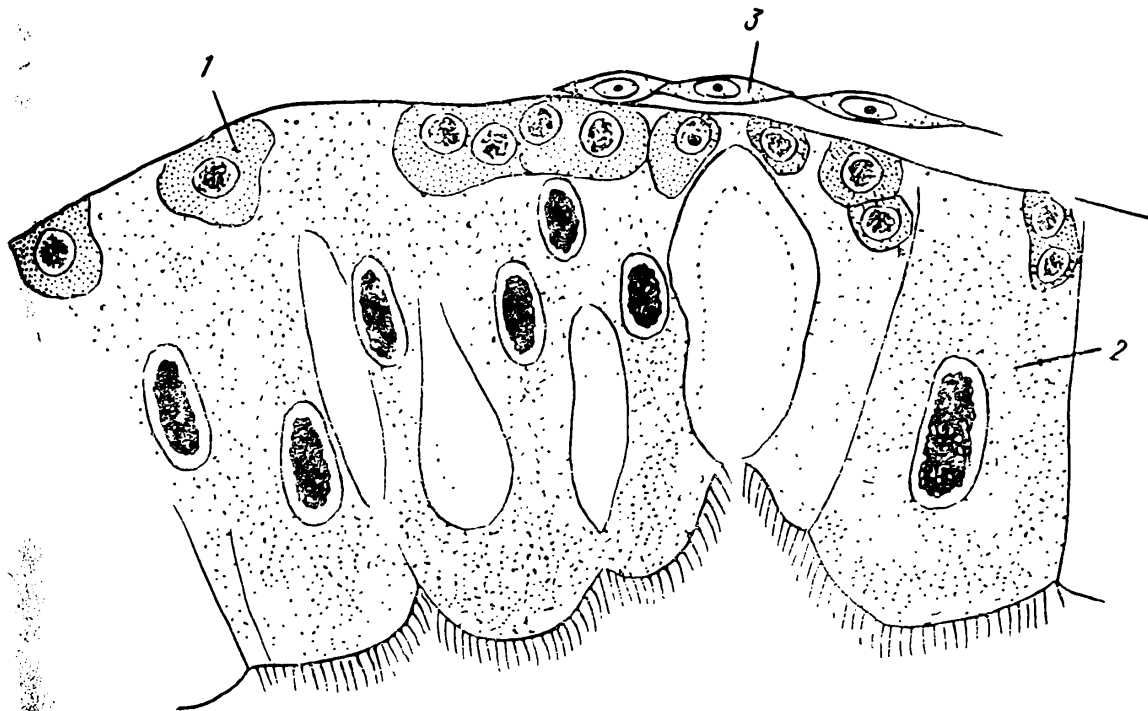


Рис. 48. Разрез через стенку средней кишки личинки *Pieris brassicae*. Ув. 7×90.

1 — имагинальные клетки, 2 — личиночные клетки, 3 — соединительнотканые клетки на поверхности кишки.

* Дальнейшее развитие крыла у *Pontania* описано О. М. Ивановой-Казас и Л. А. Ивановой [1964].

клеток, отличающихся грубоволокнистой цитоплазмой и большими овальными ядрами с плотным скоплением хроматина (рис. 48). На обращенной к просвету кишки поверхности личиночных клеток находится так называемая щеточная каемка, которая (как показали электронно-микроскопические исследования, проведенные на разных насекомых) состоит из микроворсинок. В кишечном эпителии встречаются также клетки, содержащие большие вакуоли. У основания личиночных клеток под базальной мембраной располагаются по одной или небольшими группами имагинальные клетки. Они гораздо мельче личиночных, их ядра имеют округлую форму, а хроматин рассеян в виде мелких зернышек, базофильная цитоплазма выглядит более гомогенной, чем у личиночных клеток.

После прекращения питания перед метаморфозом личиночные клетки средней кишки слущиваются в ее просвет, а за счет имагинальных клеток формируется новый кишечный эпителий. У некоторых бабочек такое же обновление эпителия средней кишки происходит при каждой линьке.

ИГЛОКОЖИЕ

С развитием иглокожих можно познакомиться на примере морских звезд (*Asterias rubens*) и морских ежей (*Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongyloc. nudus*, *Strongyloc. intermedius*).

1. РАЗВИТИЕ МОРСКОГО ЕЖА

*Strongylocentrotus droebachiensis*ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ
И ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

Самки *Strongyloc. droebachiensis* со зрелыми половыми продуктами встречаются на сублиторали Баренцева моря в июне и в сентябре-октябре, а самцы с марта по октябрь. Созревание яиц у морских ежей идет синхронно во всех гонадах данной особи. Для изучения ранних стадий развития проводят в лаборатории искусственное осеменение яиц. Поскольку половой диморфизм у морских ежей не выражен, для получения зрелых гамет нужно иметь наготове несколько особей. Вскрытие проводят над кюветой. Разрезая панцирь морского ежа по экватору большими ножницами, удаляют оральную сторону животного. У зрелых особей гонады занимают почти всю полость тела и имеют вид массивных лопастей оранжевого цвета, расположенных радиально в петлях кишечника (рис. 49). Из куточка гонады следует приготовить мазок и, рассмотрев его под микроскопом, по наличию в мазке яйцеклеток или спермиев установить пол животного. Приобретение навыка позволяет это делать невооруженным глазом, в частности, по цвету половых продуктов: сперма — белая, икра (яйцеклетки) — желтоватая. Искусственное осеменение яиц морского ежа рекомендуется проводить в холодной комнате или аквариальной при температуре 8—15 °С. Яйца получают следующим способом: вскрытого морского ежа помещают над отверстием банки, наполненной профильтрованной морской водой, так, чтобы его аборальный полюс, где располагаются гонопоры, был погружен в воду. Зрелые яйца струйками опускаются на дно банки. Выделение яиц можно стимулировать, капая на гонады такого животного 3,6%-й раствор NaCl или KCl. Полученные яйца промывают

чистой морской водой. Участки семенника измельчают в часовых стеклах с морской водой. Пробу яиц в капле воды помещают на предметное стекло и при микроскопировании убеждаются в зрелости и однородности ооцитов, затем тут же на предметное стекло добавляют каплю взвеси сперматозоидов. При малом увеличении микроскопа наблюдают отделение оболочки оплодотворения от поверхности яйца. После этого осеменяют основную массу яиц, внося в кристаллизатор с холодной морской водой взвесь яиц и несколько капель семенной жидкости. Легко покачивая сосуд, смешивают половые продукты.

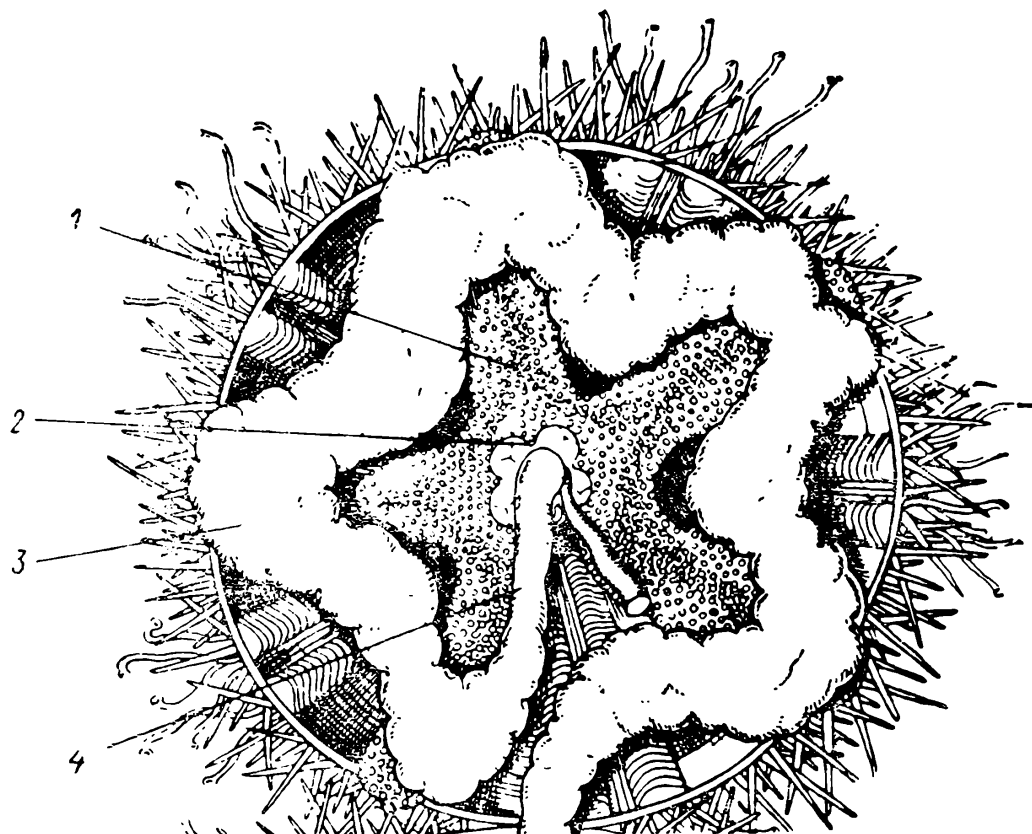


Рис. 49. Общий вид вскрытого морского ежа *Strongylocentrotus* с аборальной стороны (из Большого практикума по зоологии беспозвоночных, 1946).

1 — половая железа, 2 — проток половой железы, 3 — средняя кишка, 4 — задняя кишка.

Оплодотворенные яйца промывают чистой морской водой (они оседают на дно сосуда, так, что надосадочную воду легко заменить чистой). Зародыши иглокожих развиваются успешно при температуре, характерной для их нормальной среды обитания в данное время года. Рекомендуется дополнительная аэрация и перемешивание воды в сосуде, где идет развитие. После того как из яйцевых оболочек выйдет плавающий зародыш (бластула), воду со взвешенными зародышами сливают, отделяя от осадка — неоплодотворенных яиц или дефектных зародышей.

Сроки наступления последовательных стадий развития зародыша морского ежа следующие:

стадия:	время после осеменения:
2 бластомера	1 ч 40 мин
8 бластомеров	3 ч 35 мин
16 «	4 ч 30 мин
бластула	14 ч
средняя гастрюла	27 ч
диплеврула	42 ч
средний плутеус	58 ч

При наличии хорошей оптики и особенно с использованием фазовоконтрастного устройства можно делать прижизненные наблюдения за развитием личинок. Для этого на предметный столик микроскопа устанавливают микроаквариум с проточной морской водой. Объем микроаквариума не должен превышать нескольких десятых долей миллилитра, положение личинок в поле зрения фиксируется волокнами «стеклянной ваты».

После оплодотворения в поверхностном слое яйца протекают процессы, получившие название кортикальной реакции. Видимым ее проявлением является отслаивание желточной оболочки, покрывающей ооцит. При этом свойства желточной оболочки изменяются, и ее с этого момента называют оболочкой оплодотворения. При комнатной температуре она отделяется в течение минуты, а при низкой температуре — в течение нескольких минут после осеменения. Обособление оболочки оплодотворения начинается с появления пузыря в одном месте на поверхности яйца, а затем отслоение постепенно распространяется по всей окружности (рис. 50, а). Помимо оболочки оплодотворения у морских ежей образуется еще одна оболочка — гиалиновая мембрана. Она тесно прилегает к поверхности яйца, а позднее — к наружной поверхности бластомеров и способствует на ранних стадиях развития сохранению целостности зародыша. Прижизненно можно наблюдать также процессы дробления, гастрюляции и начальные стадии метаморфоза (см. ниже).

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Для изготовления тотальных препаратов зародыши и личинки иглокожих лучше фиксировать в насыщенном водном растворе сулемы в течение 5 мин. После фиксации зародыши помещают на некоторое время (5—10 мин) в раствор Люголя или смесь 70%-го спирта с 6%-м иодом (в соотношении 1:1), а затем в 70%-й спирт. Хорошие результаты дает окраска фиксированного таким способом материала спиртовым кармином, разведенным примерно на 2/3 70%-м спиртом. Красить в течение 12—14 ч. Окрашенный материал обезвоживают, проводя

его через ряд спиртов возрастающей концентрации (70—80—96_I—96_{II}—100_I—100_{II}%-ный) оставляя в каждом на 10 мин (100%-ный спирт можно заменить изобутиловым). Из абсолютного спирта объект помещают на 10 мин в нагретую до 37°C смесь 100%-го спирта с ксилолом (2 части спирта и 1 часть ксилола). Затем переносят в смесь абсолютного спирта

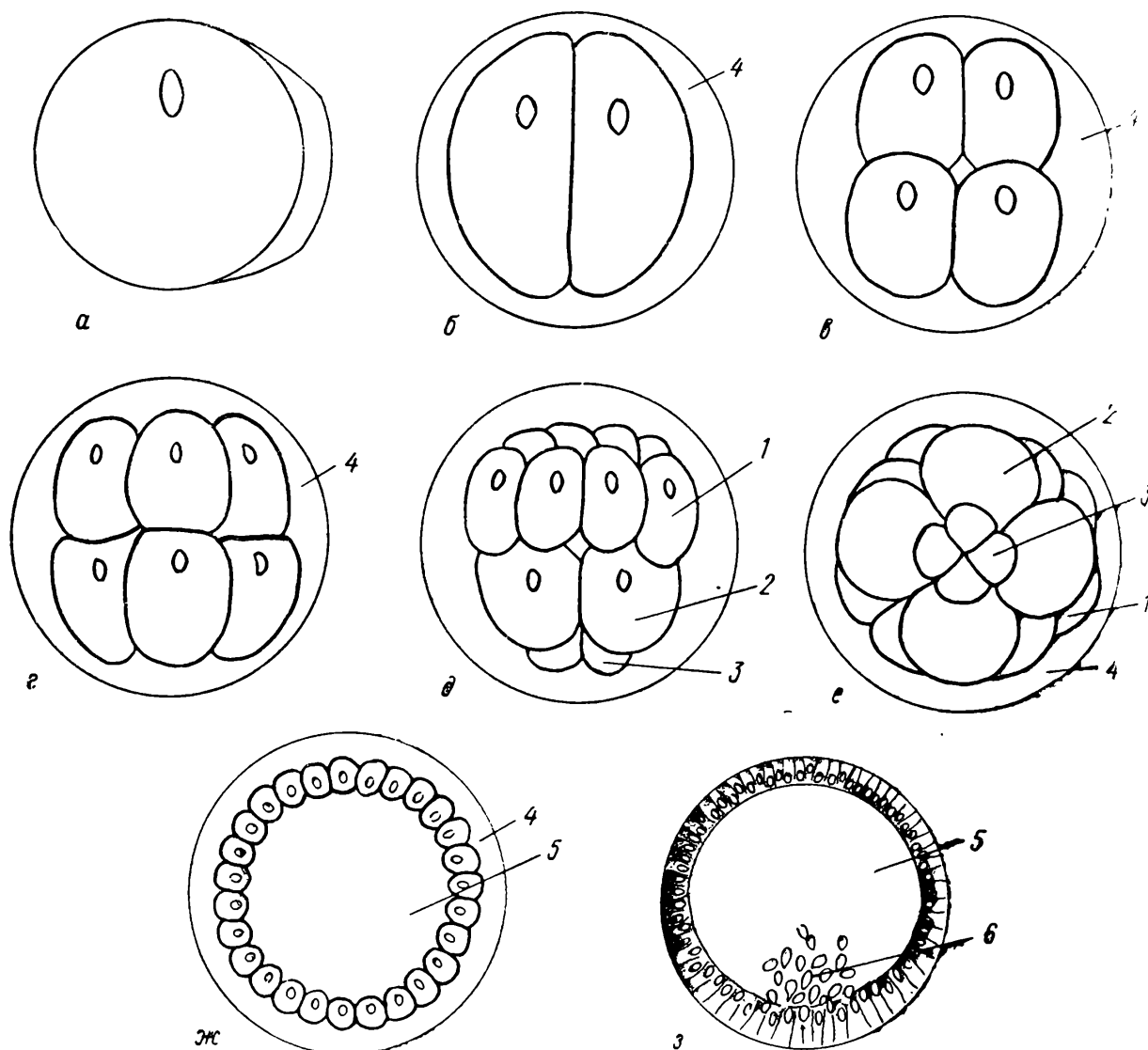


Рис. 50. Ранние стадии развития морского ежа *Strongylocentrotus*.

а — начало образования и обособления оболочки оплодотворения, б — 2 blastomeres, в — 4, г — 8, д — е — 16 blastomeres (д — вид сбоку, е — с вегетативного полюса), ж — ранняя blastula, з — свободноплавающая blastula; 1 — мезомеры, 2 — макромеры, 3 — микромеры, 4 — оболочка оплодотворения, 5 — blastocoele, 6 — клетки первичной зенхимы.

с ксилолом, содержащую 1 часть спирта и 1 часть ксилола. И наконец, в смесь, состоящую из 1 части спирта и 2 частей ксилола. Из последней смеси объект переносят в ксилол, а затем проводят материал через три смеси ксилола с балзамом (в соотношении 2:1, 1:1 и 1:2). Все эти процедуры проводят при температуре 37°C. Проводку через смеси веществ лучше осуществлять в невысоких широких пробирках, перенося заряды из одной пробирки в другую пипеткой. Поместив заряд

дыш в капле бальзама на предметное стекло, его осторожно закрывают покровным, устанавливая последнее на «ножках». Стадии 2, 4 и 8 бластомеров. Яйца морских ежей относятся к изолецитальному типу; они мелкие (80—100 мкм) и содержат мало желтка. Дробление яиц морских ежей полное, несколько отклоняющееся от радиального типа, и до стадии 16 бластомеров равномерное. Первое деление яйца проходит в меридиональном направлении и приводит к образованию двух одинаковых бластомеров (рис. 50, б); после второго тоже меридионального деления образуется 4-клеточный зародыш (рис. 50, в). Третье деление яйца проходит в экваториальной плоскости, поэтому на стадии 8 бластомеров клетки располагаются в виде двух квартетов — анимального и вегетативного (рис. 50, г), причем анимальные клетки лежат над вегетативными, а не чередуются с ними, как при спиральном дроблении (см. с. 67).

Стадия 16 бластомеров. 16-клеточный зародыш состоит из бластомеров, отличающихся по положению, размерам, цитоплазматическим компонентам и перспективному значению (рис. 50, д, е). Такое расположение бластомеров является следствием того, что при 4-м делении анимальные бластомеры делятся равномерно в меридиональном направлении, а вегетативные — неравномерно в широтном направлении. Соответственно на стадии 16 бластомеров различается венчик из 8 анимальных клеток среднего размера (мезомеров), под ними 4 субэкваториальных макромера, а на вегетативном полюсе — 4 микромера. На этой стадии имеется уже небольшой бластоцель. В процессе последующего дробления различие в размерах клеток постепенно сглаживается.

Стадия бластулы. У морского ежа образуется типичная целобластула, в которой слой практически одинаковых по размеру округлых бластомеров окружает обширный бластоцель (рис. 50, ж). Несколько позже бластомеры принимают характер высоких цилиндрических клеток, на наружной поверхности которых формируются реснички. Бластула освобождается от оболочки оплодотворения и становится свободноплавающей личинкой (рис. 50, з). Вегетативная стенка поздней бластулы немного уплощена и утолщена.

Стадия гастрюлы. Гастрюляция начинается с иммиграции в бластоцель на вегетативном полюсе бластулы клеток первичной мезенхимы. Затем здесь же часть стенки зародыша впячивается в бластоцель, и постепенно формируется узкий цилиндрический первичный кишечник — архентерон (рис. 51, а, б). Таким образом, в процессе гастрюляции сочетаются элементы иммиграции и инвагинации. При прижизненном наблюдении гастрюляции с помощью фазово-контрастного устройства можно заметить, что клетки в месте гастрюляции образуют лопасти и псевдоподии (цейтраферная микрокиносъемка выявляет их

пульсационную активность, она особенно значительна у клеток крыши архентерона: ищущие движения их псевдоподий направлены к противоположной стенке бластоцеля, прикрепившись к которой они как бы подтягивают архентерон). В конце гастрюляции из дна архентерона в бластоцель выселяются клетки вторичной мезенхимы. На препарате видно, что бластоцель не только сохраняется, но бывает значительно обширнее гастрюцеля. Одновременно с гастрюляцией клетки первичной мезенхимы формируют элементы личиночного скелета — 3-лучевые известковые спикулы (рис. 51, б, в).

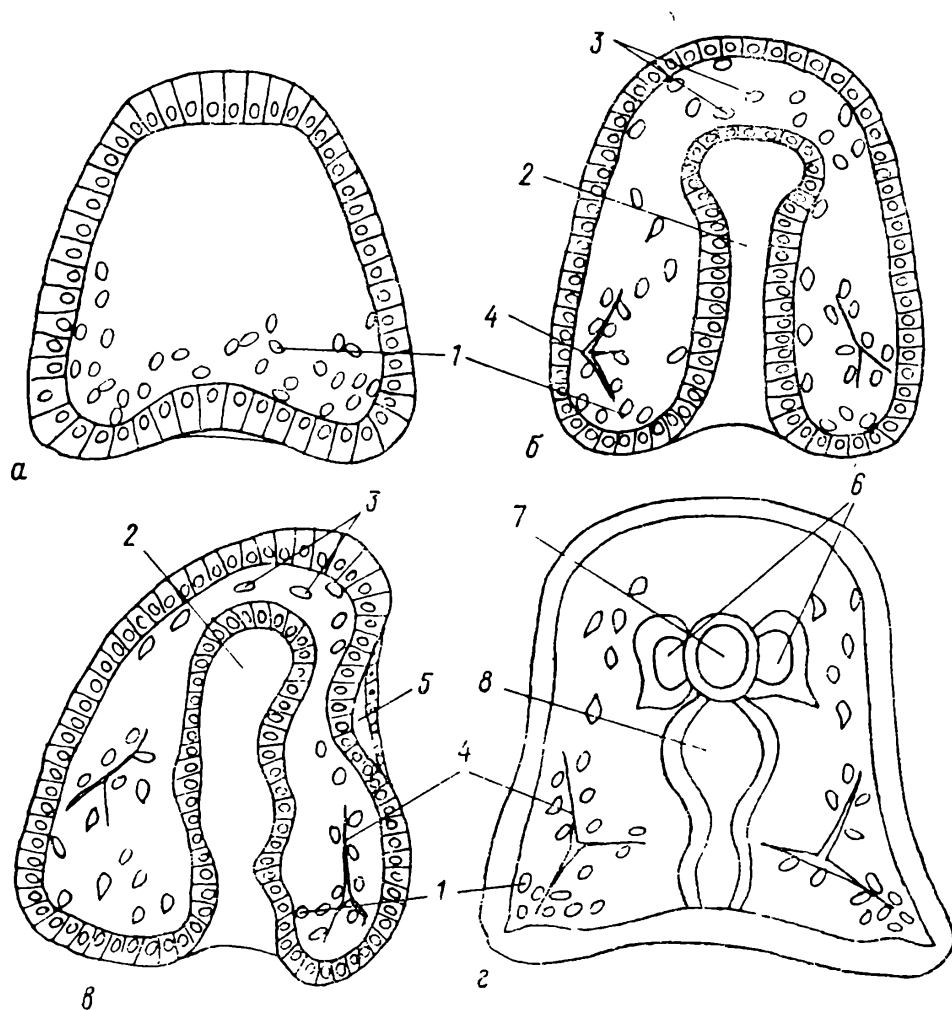


Рис. 51. Последовательные стадии гастрюляции морского ежа *Strongylocentrotus* [Gustafson, 1981].

а — начало гастрюляции, б — поздняя гастрюла, в — стадия «призмы», г — обособление первичного целомического пузырька; 1 — клетки первичной мезенхимы, 2 — архентерон, 3 — клетки вторичной мезенхимы, 4 — скелетные иглы, 5 — околоротовая впадина, 6 — целомические пузырьки, 7 — пищевод, 8 — желудок.

На стадии обособления первичного целомического мешочка изменяется форма зародыша: анимальный конец сужается, вегетативный становится более плоским. При этом анимально-вегетативная ось несколько искривляется, и анальное отверстие (бывший бластопор) оказывается на плоской брюшной стороне личинки. Впереди от анального отверстия образуется око-

лоротовая впадина с двумя бугорками по ее краю — зачатками рук. Зародыш, имеющий такую форму (рис. 51, в), называется угловатой гастролой или стадией тетраэдра (призмы). Архентерон тоже искривляется, от его дна отделяется непарный целомический мешочек (энтероцель), который несколько вытянут в направлении, перпендикулярном к оси архентерона. Несколько позднее энтероцель разделяется на правый и левый целомы (рис. 51, г).

На стадии диплеврулы (рис. 52) архентерон уже подразде-

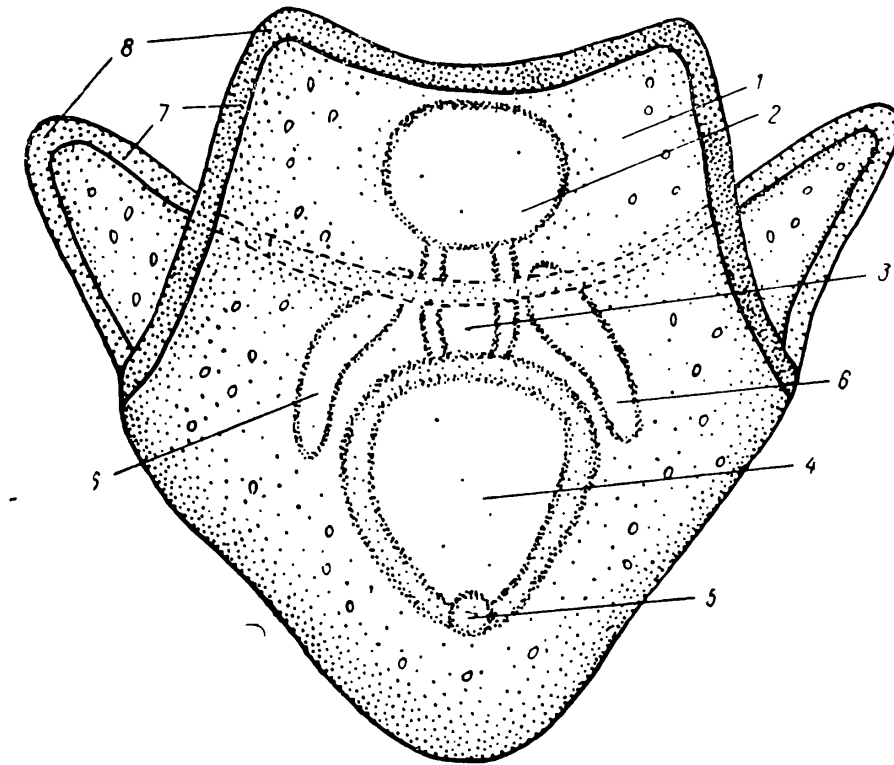


Рис. 52. Диплеврула морского ежа *Strongylocentrotus*.

1 — околоротовая впадина, 2 — ротовое отверстие, 3 — пищевод, 4 — желудок, 5 — анальное отверстие, 6 — целомы, 7 — ресничный шнур, 8 — зачатки рук.

лен на зачатки пищевода, желудка и тонкой кишки. Контуры околоротовой впадины, занимающей всю переднюю половину брюшной стороны, напоминают трапецию. На дне околоротовой впадины из впячивания эктодермы образуется глотка, соединяющаяся с зачатком пищевода. Правый и левый целомы подразделяются в конце этой стадии на передний аксогидроцель и задний соматоцель. Исчезают жгутики, покрывающие всю личинку, формируется ресничный шнур, окаймляющий околоротовую впадину. Диплеврула морского ежа превращается в эхиноплутеус, строение которого будет описано ниже. Период пеллагической жизни эхиноплутеуса продолжается больше месяца, а затем происходит метаморфоз — редукция личиночных частей и формирование внутри эхиноплутеуса маленького радиально-симметричного морского ежа, который переходит к донному образу жизни.

2. РАЗВИТИЕ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ

Asterias rubens

ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

Морских звезд собирают на литорали во время отливов вручную или сачком с лодки и содержат затем в аквариумах большого объема или ваннах. При длительном содержании морских звезд кормят моллюсками, обычно мидиями. Пол животных определяют при вскрытии, сделав временный препарат из содержимого гонады.

Для прижизненного изучения развития в лабораторных условиях морские звезды менее удобны, чем морские ежи, так как у них созревание и выметывание половых продуктов происходит не так синхронно. Степень созревания ооцитов различается даже в отдельных лучах одной самки. Однако в связи с тем, что в районах некоторых морских биологических станций (например, на Белом море) морские ежи не являются массовым литоральным видом, приходится работать с морскими звездами. В связи с этим разработаны методики искусственной стимуляции созревания и выметывания гамет. Установлено, что в развитии ооцитов морских звезд на стадии профазы мейоза происходит остановка, которая прерывается под действием гормона, выделяемого фолликулярными клетками гонады. Этот гормон — I-метиладенин, в свою очередь, выделяется в результате действия нейросекреторного фактора, синтезируемого клетками нервных тяжей, в частности радиального нерва. Поэтому массовое созревание и выметывание гамет можно вызвать двумя способами: инъекцией экстракта радиального нерва или непосредственно введением I-метиладенина.

Для получения нейросекреторного вещества, или фактора выметывания гамет, используют крупных животных — доноров. Лучи морской звезды отрезают у основания и помещают оральной стороной вниз на дно кюветы. Затем латеральными разрезами вдоль луча удаляют его аборальную стенку для облегчения дальнейших операций. Оральную половину споласкивают морской водой, переворачивают наружной поверхностью кверху и удаляют пинцетом амбулакральные ножки, обнажая при этом радиальный нерв (рис. 53). Радиальный нерв извлекают пинцетом и помещают в морскую воду. Для инъектирования ооцитов самки морской звезды следует отпрепарировать 15 радиальных нервов, т. е. от трех звезд-доноров. Извлеченные радиальные нервы растирают в ступке в 5 см³ пресной воды. Вводят в полостную полость каждого луча морской звезды по 1 см³ полученной суспензии, желательно в области расположения гонады, т. е. вблизи орального диска. Инъектированные звезды содержат при температуре 7—9°C во влажных кюветах или по-

щают оральной стороной вниз на хорошо смоченную морской водой «подушку» из фильтровальной бумаги.

После инъектирования самок следует заняться приготовлением суспензии спермиев. Для этого вскрывают самца и извлекают гонады. Отпрепарированные семенники помещают в кристаллизатор с небольшим количеством морской воды (морская вода для всех операций, связанных с получением половых продуктов и искусственным осеменением, должна быть профильтрована), где их тщательно измельчают ножницами. Затем в кристаллизатор добавляют такое количество морской воды, чтобы суспензия была слегка мутной, но прозрачной, и оставляют при температуре 7°C на 1—1,5 ч, в течение которых происходит физиологическая активация сперматозоидов. Перед осеменением их подвижность контролируют под микроскопом. При температуре 7°C вымет икры начинается через 1—2 ч после инъекции. Самку морской звезды помещают над сосудом с морской водой так, чтобы абральная поверхность звезды, где располагаются гонопоры, была в воде, а остальное тело оставалось на воздухе. Вымет продолжается около одного часа. После того как вся икра осядет на дно сосуда, осторожно сливают воду, а затем промывают икру еще раз. В выметанных после инъекции яйцах зародышевые пузырьки не различаются. Такие яйца характеризуются высокой оплодотворяемостью.

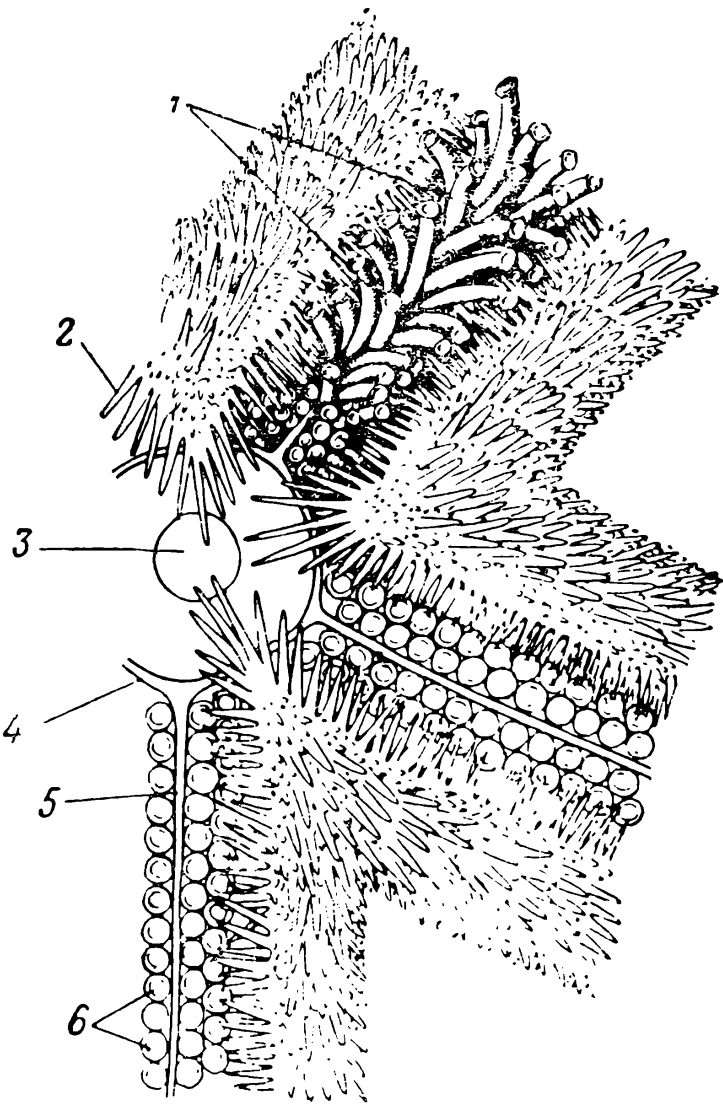


Рис. 53. Эктоневральная система морской звезды, *Asterias rubens*, (вид с оральной стороны). Амбулакральные ножки удалены (Из большого практикума по зоологии беспозвоночных, 1946).

1 — амбулакральные ножки, 2 — иглы по краю амбулакрального желобка, 3 — ротовое отверстие, 4 — кольцевой нерв, 5 — радиальный нерв, 6 — отверстия для амбулакральных ножек.

Для осеменения в сосуд с икрой наливают небольшое количество морской воды (высота столба воды не превышает 3 см) и пипеткой вносят заранее приготовленную семенную жидкость; при этом воду с икрой осторожно перемешивают стеклянной палочкой, не касаясь стенок сосуда. Через 1—2 мин берут пробу для микроскопирования. Если каждое яйцо окружено более 5—7 спермиев, следует для избежания полиспермии в сосуд с осемененной икрой добавить морской воды. При недостатке сперматозоидов добавляют пипеткой суспензию. Через 5—10 мин под микроскопом можно наблюдать образование оболочки оплодотворения (см. описание оплодотворения у морского ежа). В этот момент нужно слить воду с содержащимися в ней сперматозоидами и тщательно (не менее 2 раз) промыть оплодотворенную икру, сливая воду после осаждения яиц. Затем оплодотворенные яйца распределяют тонким слоем (желательно в один ряд) на дне кристаллизатора и заливают свежей порцией воды. До образования плавающей личинки (бластулы) воду следует менять через каждые 2—3 ч. Сроки наступления стадий развития морской звезды при температуре 7°C следующие:

стадия развития:	время после осеменения, ч:
2 бластомера	5—6
4 «	7—8
8 «	9—10
16 «	11—12
ранняя бластула	18
поздняя «	36
начало гастрюляции	48—50
диплеврула	240

Кроме прижизненных наблюдений стадии развития иглокожих можно изучать на постоянных препаратах, техника изготовления которых такая же, как при работе с морским ежом (см. с. 109).

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Стадии 2, 4 и 8 бластомеров. Яйца *Asterias rubens* изолецитального типа, содержат мало желтка, дробление их полное равномерное. Стадии 2 и 4 бластомеров (рис. 54, а, б) схожи с описанными для развития морского ежа (с. 111). Восьмиклеточный зародыш также представлен двумя лежащими друг над другом квартетами бластомеров, причем нижние, вегетативные несколько крупнее анимальных (рис. 54, в). При дроблении яйца бластомеры после каждого деления округляются и поэтому соприкасаются друг с другом только небольшой частью своей поверхности.

Стадия 16 бластомеров. В отличие от дробления морского ежа, при четвертом делении все клетки зародыша морской звезды делятся в меридиональном направлении, поэтому на стадии 16 бластомеров микро-, макро- и мезомеры не отличаются друг от друга (рис. 54, г). Между бластомерами образуется небольшая полость.

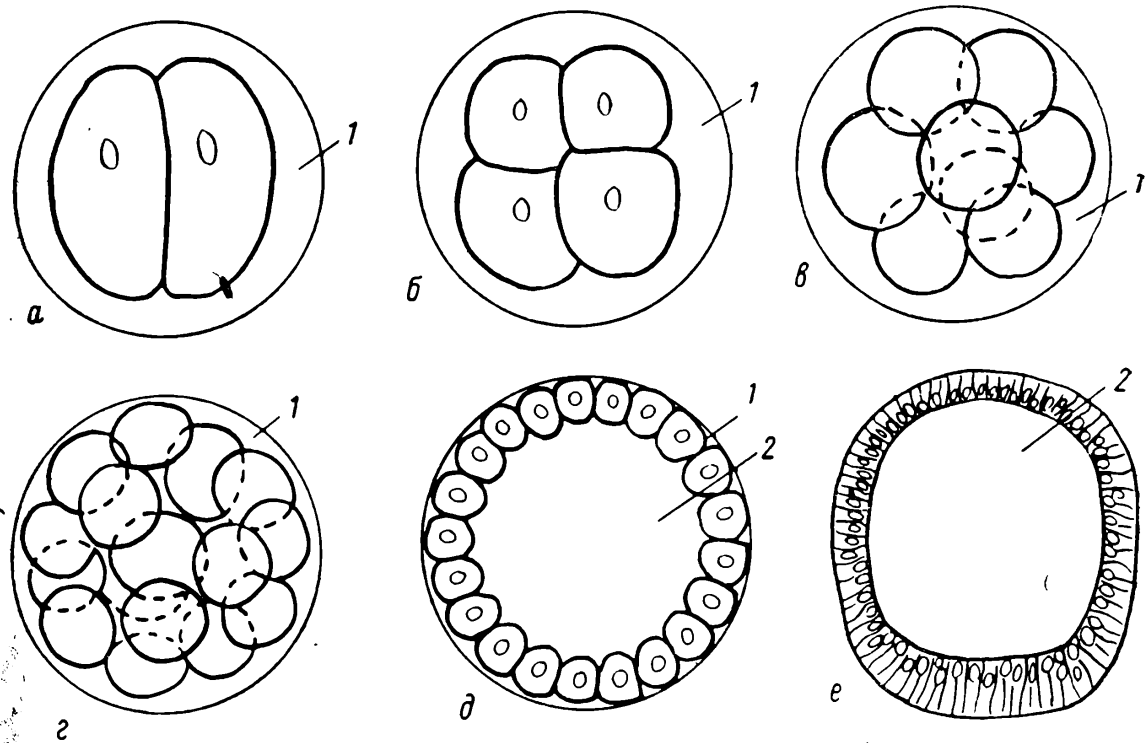


Рис. 54. Ранние стадии развития морской звезды, *Asterias rubens*.

а — 2 бластомера, б — 4, в — 8 и г — 16 бластомеров, д — ранняя бластула, е — бластулообразная личинка; 1 — оболочка оплодотворения, 2 — бластоцель.

Стадия бластулы. Дробление завершается образованием ценобластулы — однослойного сферического зародыша (рис. 54, д). Клетки бластулы несут на своей поверхности реснички, которые на препарате не видны; сначала бластула вращается внутри оболочки, потом освобождается от нее и становится свободноплавающей личинкой. На стадии поздней бластулы клетки перестают округляться при своих делениях и приобретают вид эпителиальных, причем клетки вегетативного полюса несколько выше остальных (рис. 54, е). Поздняя бластула несколько удлинена по анимально-вегетативной оси, она характеризуется также уплощением нижнего полюса, где клеточный слой толще и выглядит более темным.

Стадия гастролы. Бластула переходит в гастролу путем ингинации толстого пласта высоких вегетативных клеток (рис. 55, а). Затем появляется довольно узкая полость — гастроль (рис. 55, б). Постепенно архентерон приобретает цилиндрическую форму; крыша его доходит лишь до середины гастролы, которая растет в длину и становится эллипсоидной.

(рис. 55, в). Из стенок и дна архентерона в полость зародыша выселяются клетки мезенхимы, они неправильной, чаще звездчатой формы, снабжены отростками. К концу гастрюляции дно архентерона слагается из более низких кубических клеток, а остальная часть его стенок — из столбчатых.

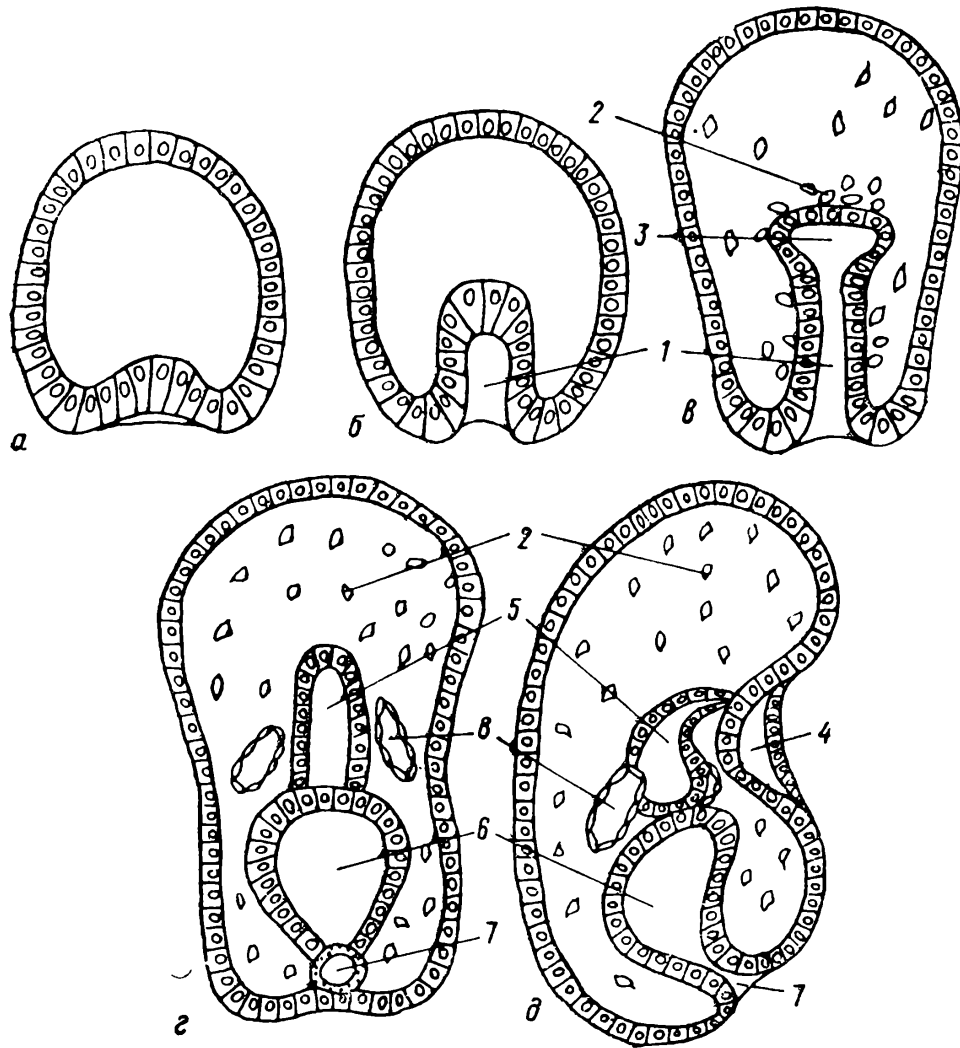


Рис. 55. Последовательные стадии гастрюляции морской звезды.

а — начало гастрюляции, *б* — образование архентерона, *в* — обособление первичного целомического мешочка, *г, д* — стадии формирования диплеврулы; 1 — архентерон, 2 — мезенхимные клетки, 3 — целомический пузырек, 4 — околоротовая впадина, 5 — пищевод, 6 — желудок, 7 — анальное отверстие, 8 — целомические мешочки.

Стадия обособления первичного целомического мешочка. После завершения иммиграции мезенхимных клеток начинается образование целомической мезодермы; тонкостенное дно архентерона расширяется и образует целомический пузырек (рис. 55, в). При отщуривании первичный целомический мешочек разделяется на правую и левую половину (рис. 55, г). Остальная часть архентерона становится средней кишкой, а blastopore — анальным отверстием.

Стадия диплеврулы. При формировании диплеврулы на вентральной стороне личинки образуется околоротовая впадина, а задний конец спинной стороны зародыша разрастается

так, что анальное отверстие смещается на вентральную сторону (рис. 55, д). Исчезает сплошной ресничный покров, и по краю околоротовой впадины образуется мерцательный шнур, состоящий из более густых и длинных ресничек. Средняя кишка разделяется на пищевод, пузыревидный желудок и короткую заднюю кишку, открывающуюся анальным отверстием. В центре околоротовой впадины прорывается рот, и личинка теперь способна питаться самостоятельно. Характерная для иглокожих личинка диплеврула формируется у морской звезды через 10—12 сут. Специализированная личинка морской звезды бипиннария описана в следующем разделе.

3. ЛИЧИНКИ ИГЛОКОЖИХ

Личинки иглокожих в значительном количестве встречаются в планктоне. На мурманском побережье Баренцева моря и в Белом море их особенно много в июле и в августе. Чаще всего попадаются личинки офиур, морских ежей, реже — морских звезд, единичны находки личинок голотурий. В планктоне встречаются личинки, находящиеся на разных стадиях развития, поэтому они могут иметь большие или меньшие отличия от изображенных на наших рисунках. Личинок морского ежа и морской звезды возможно получить и после искусственного осеменения яиц. Из личинок можно приготовить также тотальные препараты.

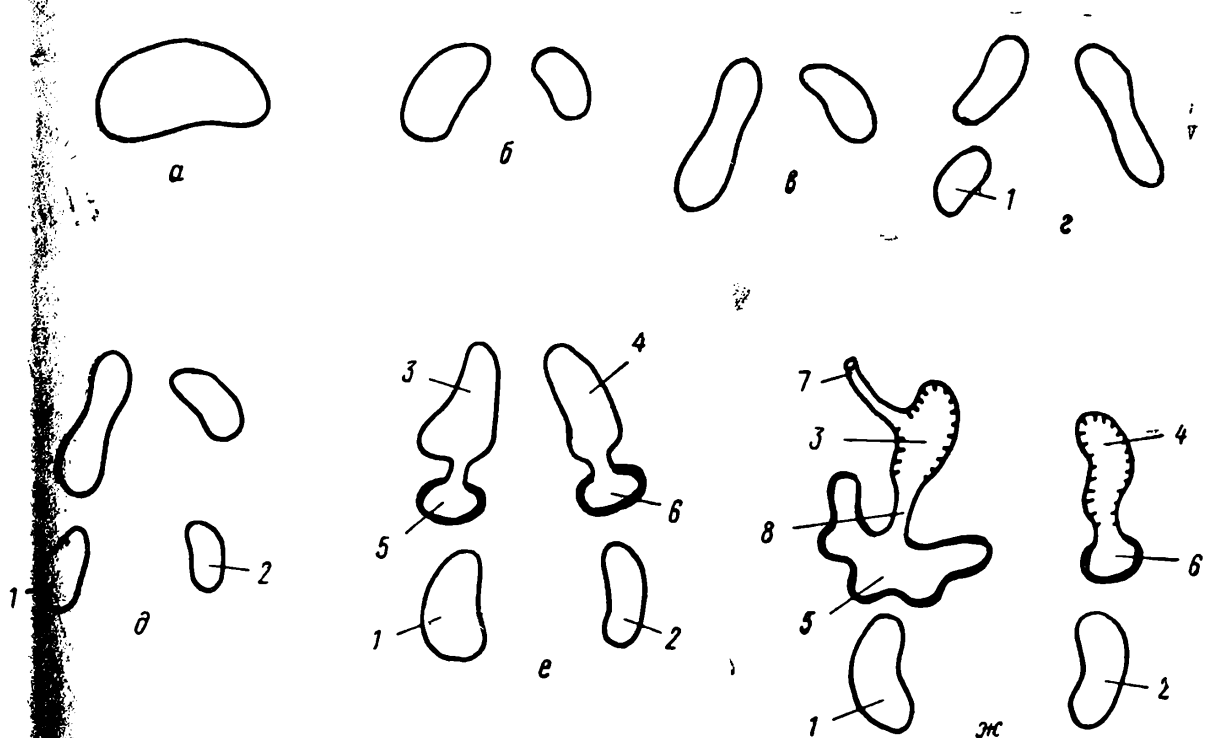


Рис. 56. Схема развития целомов в классе офиур (по Мэк Брайду из: Иванова, 1937).

а — последовательные стадии; 1 — левый задний целом, 2 — правый задний целом, 3 — левый передний целом, 4 — правый передний целом, 5 — левый гидроцель, 6 — правый гидроцель, 7 — гидропор, 8 — каменистый канал.

Большинство иглокожих проходит в своем развитии стадию диплеврулы — билатерально-симметричной личинки, из которой путем усложнения ее организации возникают личиночные формы, характерные для разных классов. Диплеврула имеет пищеварительную систему (пищевод, желудок и тонкую кишку), пару целомических мешков. Ротовое отверстие находится на дне широкой окологротовой впадины; на середине выпуклой задней части личинки располагается анальное отверстие. Эта личинка плавает благодаря мерцательному шнуру, окаймляющему края окологротовой впадины. Края ротовой впадины по мере развития диплеврулы меняют свою конфигурацию: они образуют несколько правильных выступов и впадин, расположение которых специфично для личинок разных классов иглокожих. По мере развития личинки целомы претерпевают дальнейшее расчленение, характер которого также несколько отличен у разных личинок иглокожих. Наиболее общее представление об этом процессе дает рассмотрение развития целомов в классе офиур (рис. 56). При отшнуровке от архентерона первоначально единый целомический пузырек разделяется на правый и левый целомы, причем левый обычно бывает больших размеров. Затем каждый из них подразделяется на передний целомический мешочек — аксогидроцель, и задний — соматоцель. Позднее из переднего целомического мешочка вычленяется средний, или гидроцель, но полного их разделения обычно не происходит. От переднего левого целома отходит поровый канал, открывающийся наружу гидропором. Мешковидный средний левый целом (гидроцель) принимает пятилопастную форму, чем намечается его превращение в амбулакральную систему взрослого животного. Целомы правой стороны подвергаются частичной или полной редукции.

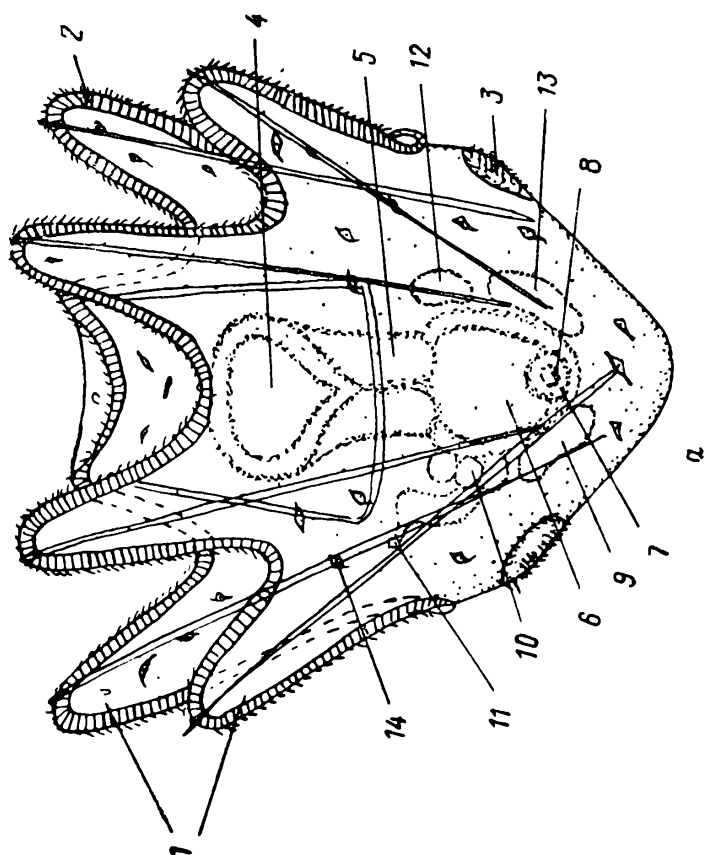
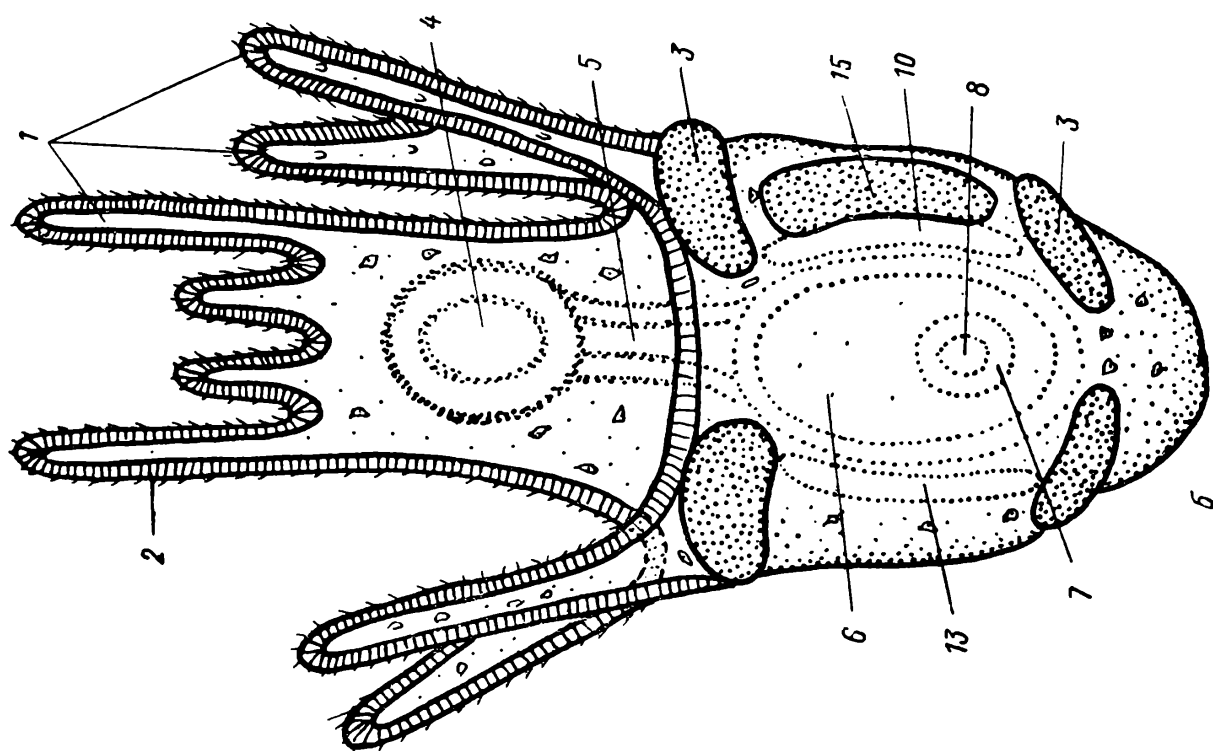
Личинки морских ежей называются **эхиноплутеусами**. Вполне сформированная личинка *Strongylocentrotus droebachiensis* имеет в длину 0,4 мм, задний конец ее закруглен (рис. 57, в). На переднем конце личинки по краям окологротовой впадины расположены длинные цилиндрические отростки — руки, поддерживаемые изнутри длинными иглами известкового личиночного скелета (рис. 57, а). Руки (их 4 пары) направлены вперед и под острым углом к продольной оси личинки. Они обладают некоторой подвижностью — могут немного сдвигаться и раздвигаться. Вдоль всех рук и по краю окологротовой впадины (ротового поля) проходит ресничный шнур. От ресничного шнура отделены участки в форме горизонтальных ресничных валиков — эполет, выступающих над поверхностью личинки. На брюшной стороне личинки спереди располагается широкое треугольной формы ротовое отверстие, а сзади — круглое анальное отверстие. Сквозь прозрачные покровы личинки просвечивает кишечник, который состоит из толстостенной передней кишки, объемистого желудка и короткой, загибающейся вентрально

задней кишки. У личинок сравнительно поздних стадий удается рассмотреть целомические мешки. Задние целомы — соматоцели, наиболее объемисты и развиты более или менее одинаково. Из средних целомов — гидроцелей, сохраняется только левый. Он соединен каменистым каналом с аксоцелом (левым передним целомом) и еще у плутеуса приобретает форму пятилопастного диска — зачатка амбулакральной системы. Правый аксоцель редуцируется, а левый сообщается с внешней средой гидротором (рис. 57, а). На левом боку личинки на уровне гидроцеля эктодерма образует амниотическое впячивание. Утолщенное дно амниотического мешка, прилегающее к гидроцелю, представляет собой имагинальный диск — зачаток органов оральной стороны морского ежа (рис. 57, б).

Личинка офиуры — **офиоплутеус**, имеет форму конуса, вершина которого направлена назад. На переднем расширенном конце находится окологротовая впадина, по краям которой располагается четыре пары очень длинных отростков — рук личинки, поддерживаемых специальными скелетными иглами (рис. 57, в). Окаймляющий руки ресничный шнур заходит на самые их верхушки. В отличие от личинки морского ежа длинные руки офиоплутеуса расходятся веерообразно. Широкое ротовое отверстие расположено на брюшной стороне личинки и ведет в толстостенную переднюю кишку, которая впадает в мешковидный желудок в заднем отделе личинки. Узкая задняя кишка загибается вперед и открывается анальным отверстием на уровне заднего конца передней кишки. Правый и левый целомы разделяются так же, как у эхиноплутеуса. К желудку прилегают задние целомы — соматоцели. Гидроцели располагаются на уровне передней кишки.

Личинка морской звезды — **бипиннария**, в конце своего развития (в возрасте около месяца) имеет крупные размеры — до 2 мм. К этому времени края окологротовой впадины образуют сложные изгибы, окаймленные ресничным шнуром. Две петли этого шнура, пройдя перед ротовым отверстием, направляются вперед и сойдясь на макушке сливаются друг с другом. Одновременно боковые части тела личинки в области ротовой впадины образуют впячивания, растущие навстречу друг другу. В результате окологротовая впадина принимает форму буквы «Н»; тогда же впереди от рта образуется предротовой щиток, а позади — анальный щиток.

После слияния передних петель ресничный шнур, идущий по краю окологротовой впадины, разделяется на два самостоятельных кольца. Меньшее, предротовое кольцо окружает предротовой щиток (фронтальное поле), а послеротовое окаймляет все остальные краевые выступы впадины (рис. 58, а). Рот ведет в кишечник, расчлененный на пищевод, расширенный желудок и тонкую кишку, которая открывается анальным отверстием на брюшной стороне личинки. По бокам от кишечника распола-



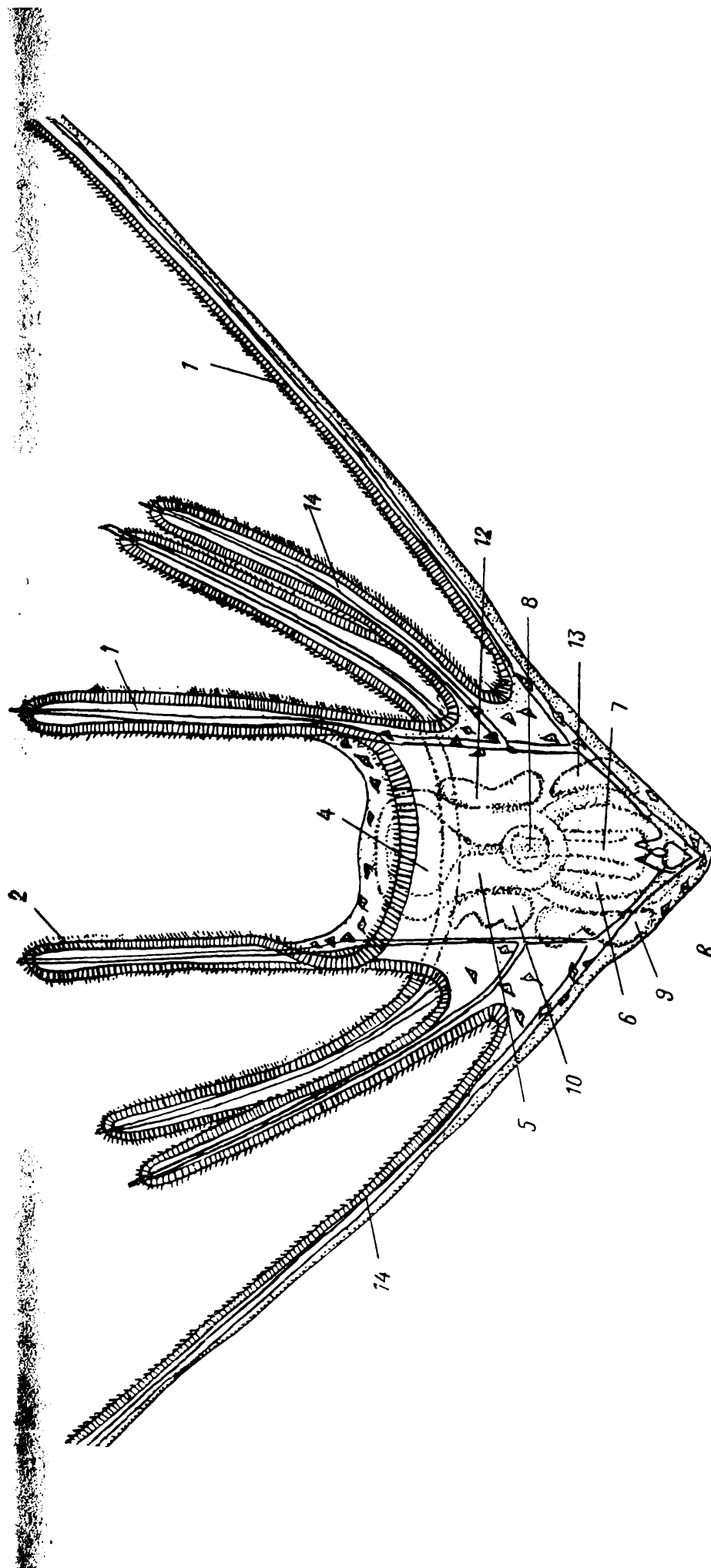


Рис. 57 Личинки морского ежа и офиуры.

a — молодой эхиноплутеус *Strongylocentrotus* in vivo (вид со спинной стороны), *б* — сформированный эхиноплутеус (вид с брюшной стороны), *в* — офиноплутеус (прижизненно — вид со спинной стороны) (*a, в*: Из Большого практикума по зоологии беспозвоночных, 1946); *1* — руки, *2* — ресничный шнур, *3* — эполеты, *4* — ротовое отверстие, *5* — передняя кишка, *6* — средняя, *7* — задняя кишка, *8* — анальное отверстие, *9* — левый задний целом, *10* — левый гидроцель, *11* — гидропор, *12* — правый передний целом, *13* — правый задний целом, *14* — скелет, *15* — имажинальный диск.

гаются целомические мешки, которые в результате разрастания в продольном направлении принимают вид трубчатых мешков. Позднее они соединяются друг с другом на переднем конце личинки. У вполне сформированной бипиннрии (рис. 58, б) по ходу ресничного шнура имеются выросты в форме коротких треугольных лопастей или более узких и длинных придатков. При движении личинки выросты могут изгибаться, влияя на характер движения. У взрослой личинки левый целомический мешок разделяется на передний и задний целома. Левый передний целом сообщается с внешней средой посредством порового канала, открывающегося наружу гидropором. Позднее утолщенная задняя стенка переднего левого целома, которая соответствует гидроцелю личинок других иглокожих, образует пять лопастей — будущих радиальных каналов амбулакральной

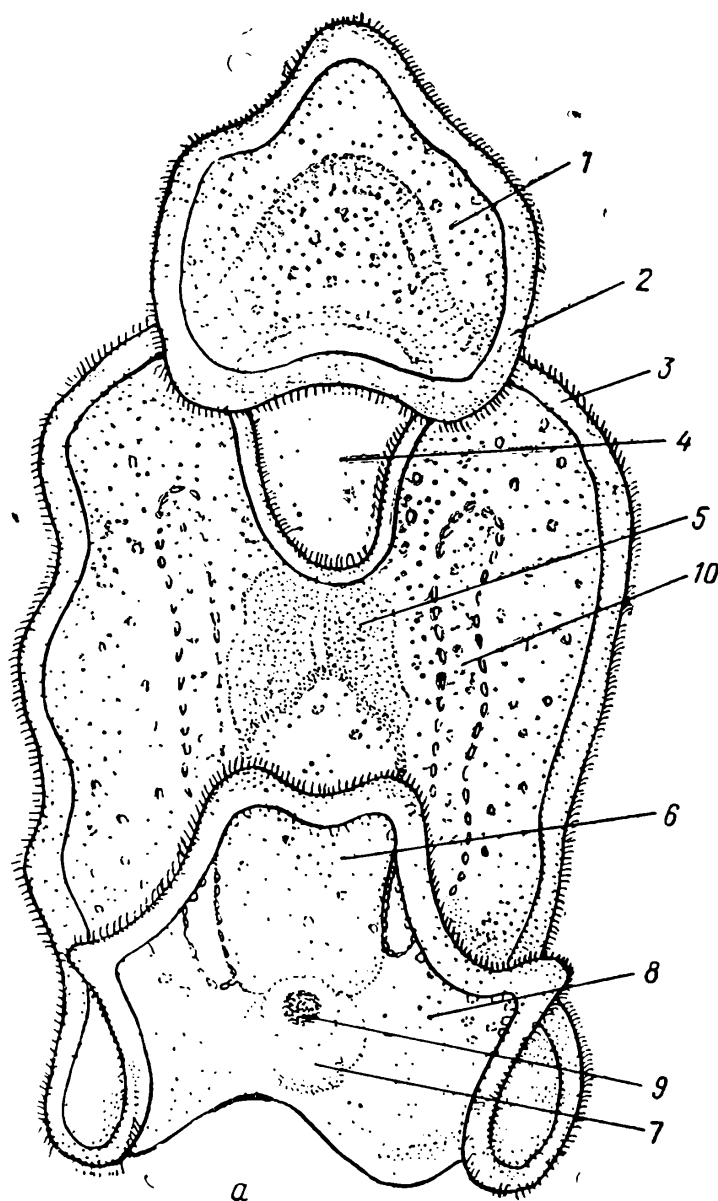
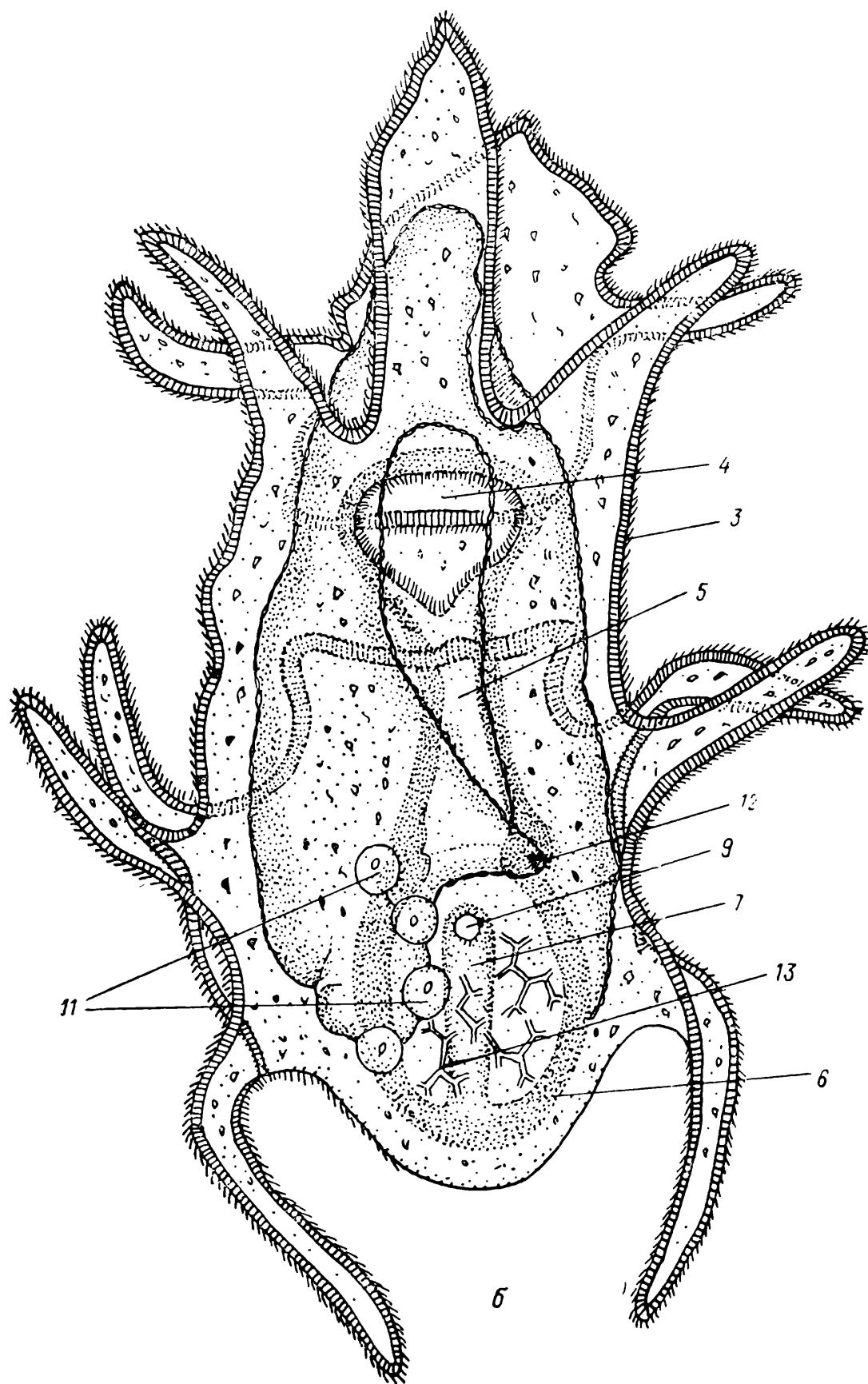


Рис. 58. Личинки морской звезды, *Asterias rubens* (Из
а — молодая бипиннрия (вид с брюшной стороны), б — взрослая бипиннрия (рис. 58, б) по ходу ресничного шнура, 3 — послеротовой ресничный шнур, 4 — ротовое отверстие, 5 — передняя стенка, 10 — левый целом, 11 — радиальные выросты гидроцеля,

системы. В образовании тела взрослой морской звезды участвует задняя часть личинки, а передняя формирует провизорный прикрепительный аппарат.



Большого практикума по зоологии беспозвоночных, 1946).

со спинной стороны); 1 — предротовой щиток (фронтальное поле), 2 — предротовой рес-
кишка, 6 — средняя кишка, 7 — задняя кишка, 8 — анальное поле, 9 — анальное отвер-
12 — гидropop, 13 — закладывающиеся элементы скелета.

ЛАНЦЕТНИК

Ланцетник, *Branchiostoma lanceolatum* — представитель хордовых животных (т. Chordata п/т Acrania). В эмбриональном развитии ланцетника можно видеть черты, исходные в эволюции эмбриогенеза позвоночных, и в то же время большое сходство с развитием вторичноротых животных. Ланцетник распространен в прибрежной зоне умеренных и теплых районов Атлантического, Индийского и Тихого океанов; в СССР — в Черном и Японском морях. Размножение ланцетника происходит в летнее время; в Черном море — с конца мая до начала августа.

Получить материал по развитию ланцетника трудно в связи с малочисленностью вида в пределах СССР. Если же такой материал имеется, то его фиксацию проводят обычно в смеси Буэна. Тотальные препараты (стадии дробления, бластулы, гастролы) приготавливают из неокрашенного материала, проводя его через спирты возрастающей концентрации, карбол-ксилол и ксилол, выдерживая в каждом из названных реактивов по 15—20 мин. Из ксилола зародышей переносят на предметное стекло в каплю густого канадского бальзама и покрывают стеклом с «ножками».

Более поздние стадии развития ланцетника — гастролу, небулу и личинок — удобнее изучать на поперечных срезах, окрашенных квасцовым гематоксилином. Для получения поперечных срезов рекомендуется заливать зародышей на целлюлозных пластинках (см. Иванов и др., 1981).

Половые железы ланцетника мешковидные, замкнутые, расположены метамерно на уровне жаберного отдела тела. Гаметы выводятся через временно возникающие протоки в атриальную полость, а из нее через атриопор во внешнюю среду. Осеменивание наружное, моноспермное.

Яйца ланцетника бедны желтком, их диаметр около 0,1 мм. В поверхностном слое ооплазмы, лишенном желтка, располо-

жены крупные гранулы — предположительно митохондрии, ядро смещено в анимальное полушарие яйца. Спермий проникает в яйцо в области его вегетативного полушария. После внедрения спермия кортикальная соплазма стягивается к месту его проникновения, образуя на поверхности яйца, ниже экватора, скопление в форме серпа, получившего название «мезодермального» в связи с перспективным значением этого участка яйца. Описанные перемещения цитоплазмы приводят к становлению «предварительной структуры» яйца ланцетника. С этого момента определяются плоскость билатеральной симметрии (она проходит через середину «мезодермального серпа») и главная ось будущего организма: середина «мезодермального серпа» соответствует заднему, а противолежащий ей участок несколько выше экватора — переднему концу зародыша. Установление предварительной структуры яйца было изучено Конклином в 1932 г. прижизненно; на постоянных препаратах наблюдать соответствующие картины затруднительно.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Стадии 2, 3, 4, 8 бластомеров (тотальные препараты). Дробление яиц ланцетника полное, не вполне равномерное, радиальное с элементами билатеральной симметрии. Первая борозда дробления меридиональная и проходит через середину «мезодермального серпа». Два образующиеся бластомера одинаковы по величине (рис. 59, а). Вторая борозда также меридиональная, проходит перпендикулярно первой борозде. На стадии четырех бластомеров два задних из них меньше передних и содержат материал «мезодермального серпа» (рис. 59, б). Третья борозда экваториальная проходит выше экватора в результате чего каждый из четырех анимальных бластомеров оказывается мельче соответствующего ему вегетативного бластомера. Большая часть материала «мезодермального серпа» содержится в задних нижних бластомерах (рис. 59, в). Впоследствии вплоть до седьмого деления меридиональные и экваториальные борозды чередуются, некоторая неравномерность величины бластомеров и билатеральная симметрия зародыша на протяжении дробления сохраняются. После каждого деления бластомеры округляются и приобретают сферическую форму. Начиная с восьмого деления дробление становится асинхронным (рис. 59, г).

Стадия бластулы (тотальный препарат, рис. 59, д). В результате дробления формируется целобластула с обширным бластоцелом. При рассмотрении зародыша, лежащего на препарате в профиль, видно, что стенки бластулы разной толщины. Крыша бластулы состоит из мелких эктодермальных клеток, дно — из более крупных энтодермальных, разделяющая их зона — из клеток средней величины, наиболее мелкие клетки «мезо-

дермального серпа». Разница в величине клеток — результат неравномерности и асинхронности их делений. На стадии поздней бластулы зародыш приобретает грушевидную форму в связи с уплощением его вегетативной области.

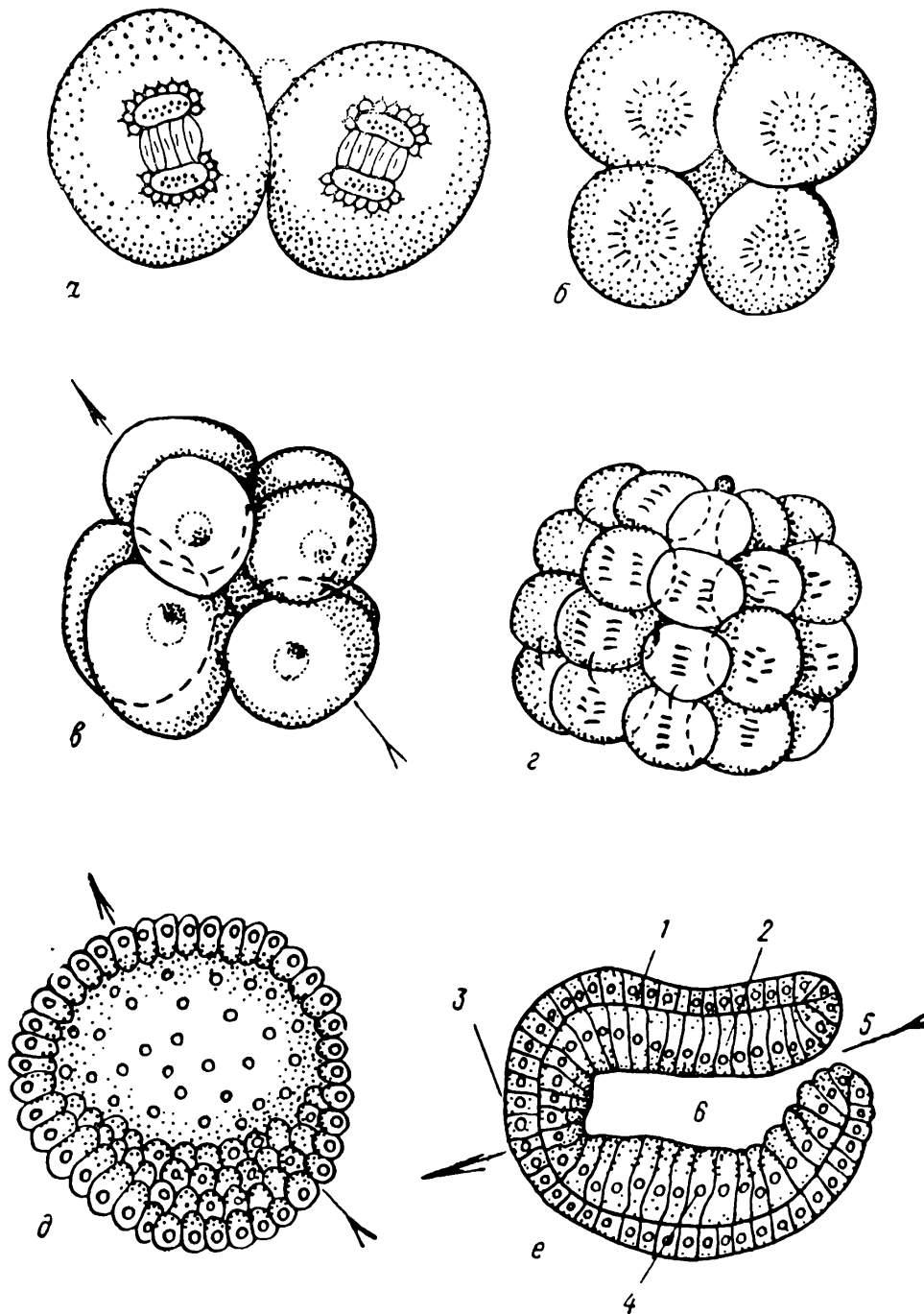


Рис. 59. Ранние стадии развития ланцетника [Conklin, 1932].

a — 2 бластомера (вид с вегетативного полюса), *б* — 4 бластомера (вид с вегетативного полюса), *в* — 8 бластомеров (вид сбоку с правой стороны), *г* — 32 бластомера, *д* — бластула, *е* — гастрюла (*д* — оптический, *е* — сагиттальный разрезы); 1 — нервная пластинка, 2 — хордальная пластинка, 3 — кожная эктодерма, 4 — энтодерма, 5 — стенодэум, 6 — полость первичной кишки.

Со стадией гастрюлы (рис. 59, *е*) можно познакомиться как по тотальному препарату, так и по срезам. Гастрюляция осуществляется путем инвагинации вегетативной области бластулы, в результате чего зародыш на стадии ранней гастрюлы при-

...екает вид двуслойной чаши с широко открытым бластопо-
 ...; ограничивающие его края называют губами бластопора.
 ...ходе инвагинации происходит перемещение материала с по-
 ...ности гастролы внутрь через губы бластопора, который по-
 ...епенно суживается. К концу гастрюляции дорсальная сторо-
 ...зародыша уплощена, вентральная выпукла, бластопор в ви-
 ...е небольшого отверстия расположен на заднем конце тела.
 ... Наружный слой гастролы образован эктодермой. Как по-
 ...казывает дальнейшее развитие, утолщенный дорсальный уча-
 ...сток эктодермы представляет собой нервную пластинку — за-
 ...чаток нервной системы. В состав стенки архентерона входят
 ...вентрально энтодерма, дорсолатерально — хордомезодерма.

Стадия нейрулы (поперечный срез). По завершении гастрю-
 ...ляции происходит обособление зачатков из состава первичных
 ...зародышевых листков, в частности зачатка нервной системы,
 ...поэтому стадия называется нейрулой. Одновременно происхо-

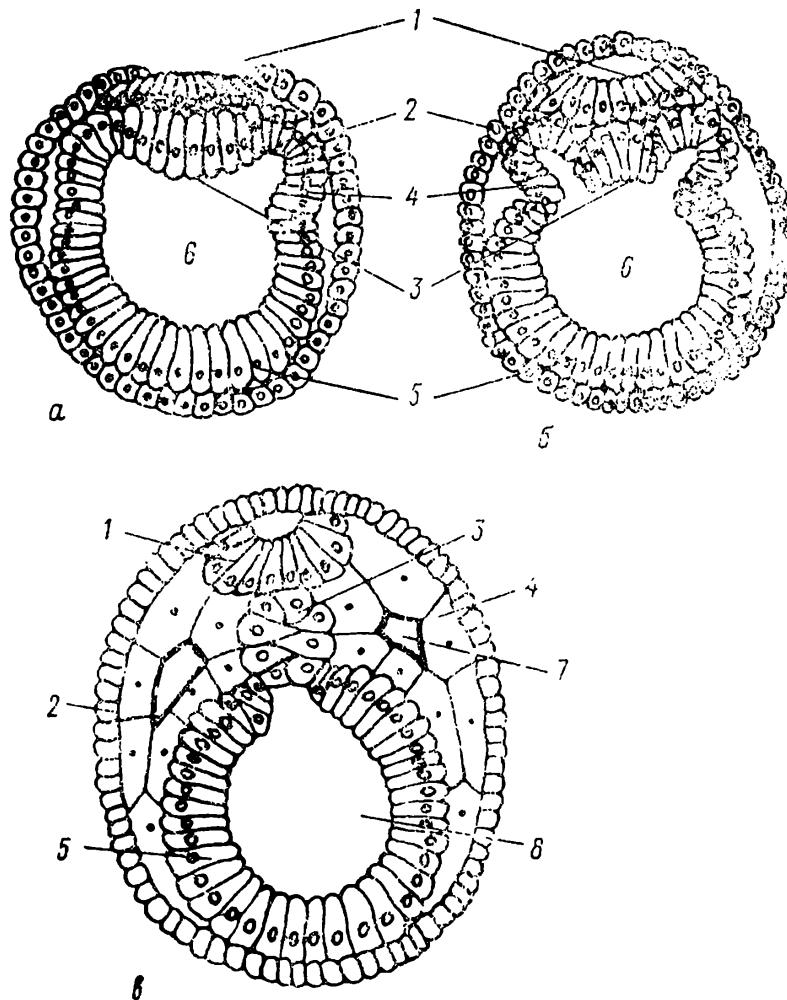


Рис. 60. Поперечные срезы зародышей ланцетника в период нейруляции [Кнорре, 1959].

...начало погружения нервной пластинки под кожную эктодерму, б — превращение
 ...ной пластинки в нервный желоб и начало обособления мезодермальных карма-
 ...от первичной кишки, в — обособление замкнутых целомических мешков, замыка-
 ...энтодермы в кишечную трубку и формирование хордального тяжа; 1 — нервная
 ...стинка, 2 — кожная эктодерма, 3 — хордальная пластинка, 4 — мезодерма, 5 — энто-
 ...дерма, 6 — полость архентерона, 7 — целомическая полость, 8 — полость кишки.

дит расчленение стенки архентерона на материал хорды, мезодермы и энтодермы. На поперечных срезах через зародышевой, находящихся на разных этапах нейруляции, можно видеть разную степень обособления этих зачатков. На стадии ранней нейрулы видно, что вычленение нервной пластинки из наружного зародышевого листка происходит благодаря нарастанию на нее окружающей эктодермы (рис. 60, а). Это приводит к погружению нейральной эктодермы под покровную. Далее нервная пластинка прогибается вдоль по средней линии (рис. 60, б), что приводит в дальнейшем к образованию нервной трубки.

Крыша архентерона представлена зачатком хорды в виде крупноклеточной пластинки (рис. 60, а). Позже хордальная пластинка желобообразно изгибается, ее выпуклая сторона обращена дорсально, а вогнутая — в полость архентерона (рис. 60, б). На более поздних стадиях благодаря смыканию краев желобка и перегруппировке клеток хорда становится плотным тяжем (рис. 60, в).

По бокам от зачатка хорды в стенке архентерона образуются два продольных более глубоких желобообразных выпячивания, представляющих собой зачаток мезодермы; на срезе они имеют вид карманообразных углублений архентерона (рис. 60, б). На поперечных срезах через более поздних зародышей видно, что после смыкания краев каждого из этих выпячиваний

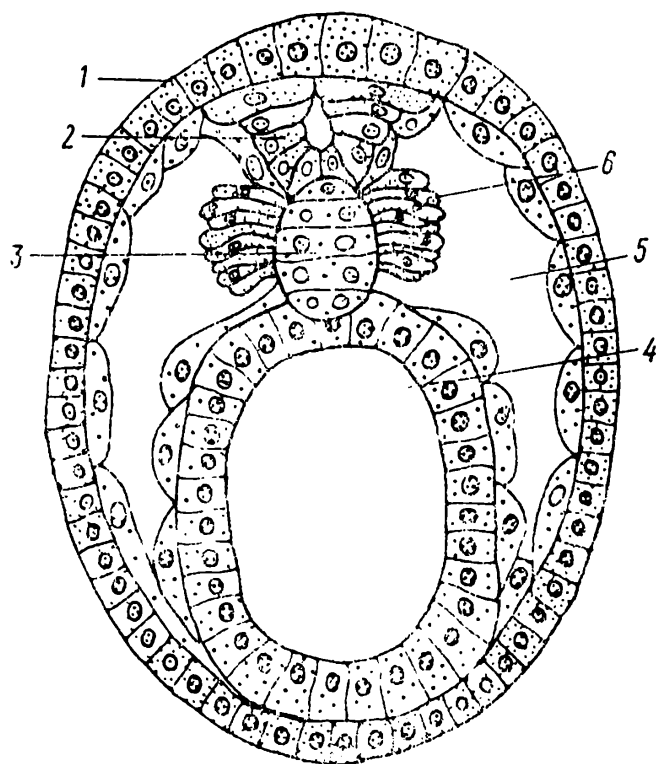


Рис. 61. Поперечный разрез зародыша после нейруляции [Иванова-Казас, 1978].

1 — покровная эктодерма, 2 — нервная трубка, 3 — хорда, 4 — кишечник, 5 — целомическая полость, 6 — зачаток мезодермы.

средний зародышевый листок полностью обособляется от энтодермы, а брюшная часть архентерона смыкается своими боковыми частями и образует кишечную трубку (рис. 60, в). Таким образом, этот препарат демонстрирует типично энтероцельный способ образования мезодермы у ланцетника. Следует иметь в виду, что по мере обособления мезодермы у ланцетника идет ее сегментация спереди назад и образование сомитов, однако на поперечных срезах это не видно. В передней части архентерона независимо от общего зачатка мезодермы формируются две пары передних (ларвальных) со-

...тов, гомологичных передним целомам низших вторичноротых. На стадии нейрулы, после образования двух передних пар со- ...тов из общего зачатка мезодермы, личинка ланцетника вы- ходит из оболочек.

Ранняя личинка ланцетника на поперечном срезе (рис. 61). Описанные выше процессы приводят к образованию осевого комплекса зачатков, характерного для типа хордовых. На поперечном срезе через тело личинки ланцетника дорсально лежит нервная трубка, под ней хорда, по бокам от которой симметрично расположены мезодермальные сомиты с хорошо развитой целомической полостью внутри. Мезодермальные сомиты впоследствии разделяются на лежащий дорсально миотом, объединяющий дермальный, мускульный и скелетогенный за- чатки, и вентрально лежащий спланхнотом. Слияние спланхно- томов вдоль правой и левой сторон тела и под кишечником приводит к образованию единого спланхноцеля. Вентрально от осевого комплекса зачатков находится кишечная трубка, выст- ланная энтодермой. Дальнейшее развитие личинки сопровож- дается закладкой органов в составе описанных выше зачатков. Личиночный период в развитии ланцетника продолжается три месяца.

КОСТИСТЫЕ РЫБЫ

1. РАЗВИТИЕ ВЬЮНА *Misgurnus fossilis* (L.)

Эмбриональное развитие костистых рыб удобно рассмотреть на примере вьюна *Misgurnus fossilis* (L.), представителя семейства вьюновых (Cobitidae) отряда карпообразных рыб (Cypriiniiformes). Вьюн широко распространен почти по всей территории европейской части СССР, кроме самых северных и южных районов. Он встречается в болотистых, стоячих или малопроточных водоемах с илистым дном: медленно текущих реках или заводях больших рек, старицах, прудах, озерах и даже болотах. В бассейне р. Амур и на о. Сахалин распространен близкий вид со сходной экологией *Misgurnus anguillicaudatus* (Cant.), который также может быть использован для эмбриологического практикума.

Вьюн крайне неприхотлив, и содержать его в лабораторных условиях очень легко. Рыбы могут находиться в обычных аквариумах даже в непроточной воде с низким содержанием кислорода, но лучше создавать слабую проточность или же время от времени заменять воду в аквариуме отстоянной водой той же температуры. Можно также установить в аквариумах микрокомпрессоры.

Вьюны способны жить без пищи в течение нескольких месяцев, если они находятся при температуре 4—6 °С. Чтобы поддерживать такую температуру, можно поместить аквариум с вьюнами в холодильник, а зимой — в ванну с проточной водой. В последнем случае необходимо установить уровенную трубку, чтобы обеспечить нужный уровень, а следовательно, и достаточный объем воды, способный охладить воду в емкости с вьюнами. Если вьюнов содержат при комнатной температуре, то кормят мотылем, дождевыми червями или мелкими кусочками мяса.

Икру вьюна можно получить уже в ноябре, используя метод дику гипофизарных инъекций, которая широко применяется в рыбоводстве и хорошо разработана для лабораторных опытов с вьюном. Таким образом, развитие вьюна можно наблюдать начиная с поздней осени и до весны, что очень удобно для учебных целей. Весной надобность в гипофизарной инъекции отпадает — достаточно просто перевести рыб в воду с темпе

ратурой 15—19 °С. Лучше всего для постановки опытов ловить выюнов каждый раз из-под льда, но если такой возможности нет, следует заготовить нужное количество половозрелых рыб с осени.

Эмбриональное развитие выюна изучено достаточно подробно. С помощью графика и специальной таблицы, составленных А. А. Костомаровой, легко высчитать время наступления той или иной стадии развития для каждой данной температуры воды, если она в течение эмбрионального развития постоянна.

По изученности эмбрионального развития выюн среди костистых рыб занимает одно из первых мест, уступая лишь радужной форели и другим лососям. Целый ряд особенностей развития рыб методически легче продемонстрировать на лососевых рыбах, но получить их икру для наблюдений сложнее, и сделать это можно только в период размножения. Кроме того, развитие икры радужной форели происходит примерно в течение полутора месяцев, а у других лососей гораздо дольше. У выюна же при температуре 18 °С оно длится около трех суток, поэтому при необходимости наблюдения можно повторить. Наконец, тип развития лососевых из-за большого количества желтка в их яйцах нехарактерен для основной массы костистых рыб (диаметр неоплодотворенных яиц лососей рода *Salmo* достигает 4—6 мм). У большинства остальных костистых рыб величина яиц колеблется от 1 до 3 мм (у выюна 1,2—1,3 мм). Это и ряд перечисленных выше обстоятельств делает выюна более предпочтительным объектом для наблюдений.

В качестве учебных объектов для ознакомления с эмбриональным развитием костистых рыб могут быть выбраны и другие широко распространенные пресноводные рыбы, например плотва, окунь, ерш. У этих рыб с помощью гипофизарных инъекций можно получить икру уже в декабре. Разумеется, они будут отличаться от выюна некоторыми особенностями развития.

ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

Гипофизарная инъекция. Если выюны были пойманы зимой из-под льда или длительное время находились в воде при температуре 4—6 °С в лабораторных условиях, их нужно постепенно перевести в воду с оптимальной для развития температурой 15—19 °С, т. е. налить воды, в которой они находились до этого, в кристаллизатор или небольшой аквариум и поставить эту емкость в жилом или рабочем помещении, где температура воды медленно подымется до комнатной. Рыб нужно оставить при этой температуре на двое-трое суток, чтобы они адаптировались и оказались физиологически подготовленными к искусственной стимуляции размножения.

Для инъектирования отбирают здоровых, активных самок весом не менее 35 г (более мелкие особи могут оказаться не половозрелыми). Сперму получают от интактных самцов (см. ниже). При этом их необязательно переводить в более теплую воду.

У самцов вьюна от заднего края спинного плавника по обеим сторонам тела почти до самого хвоста идут утолщения, или валики, представляющие собой скопления жировой ткани под кожей. Они хорошо видны со спинной стороны рыбы или же легко прощупываются пальцами. По этому признаку самцов легко распознать и отделить от самок. Кроме того, у самцов грудные плавники длиннее, чем у самок, и имеют треугольную форму (у самок они закруглены), а второй луч их грудного плавника длиннее и толще. Самки крупнее самцов, и брюшко у них несколько утолщено.

Для инъекций можно использовать свежие гипофизы вьюна или других рыб, относящихся к отряду карпообразных (сазан, лещ, карась, плотва и др.), а также гипофизы осетровых и лососевых, но не окуневых рыб. Гипофизы следует брать от половозрелых особей, в гонадах которых идет созревание половых клеток.

Гипофиз располагается в выемке парасфеноидной кости и соединяется снизу с промежуточным мозгом (рис. 62).

Для извлечения гипофиза верхние кости черепа рыбы аккуратно удаляют с помощью ножниц, таким образом обнажая мозг. Затем его осторожно приподнимают пинцетом, начиная с переднего конца, и откидывают назад. На нижней стороне мозга виден гипофиз, который теперь нетрудно отделить. При неудачной операции гипофиз отрывается и остается в выемке парасфеноида.

Извлеченные гипофизы тщательно растирают в фарфоровой ступке и заливают 0,5 мл изотонического раствора поваренной соли (0,5 г на 1 л воды). Если используются гипофизы вьюна, то для инъектирования мелких самок можно взять два, более крупных — три или даже четыре гипофиза. В полученной гомогенной суспензии гипофизарного вещества и содержится гона-

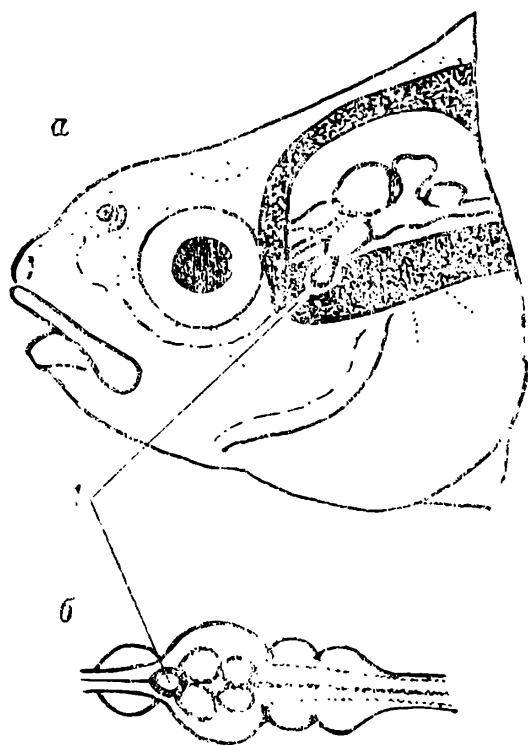


Рис. 62. Схема расположения гипофиза по отношению к мозгу и черепной коробке у леща [Фалеева, 1968].

а — расположение мозга и гипофиза в черепе (вид сбоку), б — вид мозга и гипофиза снизу. г — гипофиз.

гонадотропный гормон, который стимулирует созревание и овуляцию яйцеклеток рыб.

Дозировки свежих гипофизов, взятых от рыб других видов, для гипофизарных инъекций вьюнам не разработаны. Их можно найти экспериментальным путем, что само по себе явилось бы интересным разделом практикума. В качестве исходной дозы можно использовать суспензию вещества одного гипофиза в 0,5 мл раствора на самку вьюна, если донорами являются крупные промысловые рыбы (сазан, лещ и др.).

В рыбоводной практике для гипофизарных инъекций используют заранее заготовленные ацетонированные гипофизы, что гораздо удобнее.

При ацетонировании извлеченные гипофизы один за другим опускают в сосуд с ацетоном. Затем их последовательно переносят в 2 порции свежего ацетона: в 1-ю на 12 ч, во 2-ю на 6—8 ч. Объем безводного и химически чистого ацетона должен в 10—15 раз превышать объем находящихся в нем гипофизов. Повторно ни одну из этих порций ацетона использовать нельзя. В ацетоне происходит обезвоживание и обезжиривание ткани гипофиза.

После ацетонирования гипофизы раскладывают на фильтровальной бумаге и просушивают на воздухе. При такой обработке активность гонадотропных гормонов может сохраняться годами. Хорошо просушенные гипофизы хранят в плотно закупоренной сухой пробирке, бутылочке или даже в запаянной ампуле. Нельзя хранить гипофизы в условиях высокой температуры и повышенной влажности.

Дозировка вещества ацетонированных гипофизов сазана или леща составляет 0,3—0,5 мг на одну самку вьюна, в зависимости от ее размеров. Гипофиз растирают в фарфоровой ступке и готовят суспензию сухого гипофизарного вещества в изотоническом растворе поваренной соли. Объем введенной самке вьюна суспензии не должен превышать 0,5 мл. Поскольку вес гипофиза значительно превышает рекомендуемую дозировку, то для приготовления суспензии приходится брать больший объем раствора поваренной соли.

Созревания и овуляции яйцеклеток можно добиться также введением препарата гонадотропного гормона — хориогонина, который в качестве лекарственного средства поступает в аптеки. Доза для инъектирования одной самки составляет от 100 до 250 единиц гормона в 0,5 мл дистиллированной воды.

Оптимальной для стимуляции овуляции является температура воды 18—20°C. В этом случае при указанных дозировках созревание наступает примерно через 24—36 ч. Весной созревание, как правило, ускоряется, но в любом случае для его завершения нужно не менее суток.

Перед инъекцией выловленных с помощью сачка рыб заворачивают в марлю (иначе их трудно удержать в руках) так,

чтобы голова была на свободе, стараясь в то же время не стереть слизь с поверхности кожи, поскольку сухие участки кожи легко подвергаются инфекциям. Это, разумеется, нежелательно, если рыб будут держать в лаборатории дальше.

Нужный объем суспензии гипофизарного вещества или раствора хориогонина (0,5 мл) набирают в шприц объемом 1—2 мл. Тонкую иглу шприца вводят под небольшим углом прямо через марлю неглубоко в мышцы спины в передней трети тела острием в сторону головы. Суспензию вводят медленно и осторожно. Затем иглу вынимают и на некоторое время зажимают место укола, чтобы жидкость не вылилась из ранки.

В естественных условиях самки выюна на протяжении весны и первой половины лета выметывают через определенные промежутки времени несколько порций икры. После вымета первой порции оставшиеся в яичнике более мелкие ооциты, до сих пор медленно накапливавшие желток, быстро вырастают и могут быть выметаны в составе следующей порции и т. д. По этой причине после гормонального воздействия и получения первой порции икры самку при необходимости можно использовать повторно. Через две недели или более с помощью гипофизарной инъекции от нее можно получить по крайней мере одну порцию икры.

Искусственное осеменение. Каждую инъецированную самку желательно посадить отдельно. Рыб не следует беспокоить после инъекции в течение суток, но затем нужно установить за ними наблюдение, чтобы не пропустить момент овуляции. Созревание наступает тем быстрее, чем выше температура воды (в пределах оптимальной). Попадая после овуляции в полость яичника, икра оказывается в условиях кислородной недостаточности. Долгая задержка в полости яичника приводит к необратимым биохимическим сдвигам («перезревание»), в результате которых снижается процент оплодотворения и увеличивается количество уродливых и нежизнеспособных зародышей.

Для проверки рыбу осторожно поглаживают по брюшку в направлении от головы к хвосту. При созревании ооцитов брюшко рыбы становится мягким, а икра свободно выделяется (течет) из полового отверстия. Сильным нажатием на брюшко можно выдавить также и незрелую икру, которая не будет оплодотворяться. Поэтому при проверке следует избегать чрезмерных механических воздействий.

В половых железах самцов выюна, начиная с осени, имеется достаточное количество цист со зрелыми сперматозоидами. Самцов вскрывают с помощью маленьких ножниц с острыми концами, извлекают семенники, которые по размерам в 3—4 раза меньше яичников, и разрушают их, растирая в ступке или просто разрезая ножницами на мелкие кусочки. Затем разрушенные семенники заливают небольшим слоем отстоянной

воды комнатной температуры. Сперматозоиды из цист разрушенных семенников перейдут в воду. Концентрация их в воде будет вполне достаточной для последующего искусственного осеменения, но для верности можно использовать семенники нескольких самцов. Искусственное осеменение рекомендуется производить следующим образом. Как только установлено, что ооциты готовы к оплодотворению, надо быстро вскрыть одного-двух или более самцов, извлечь семенники и разрушить их, не заливая водой. Потом из брюшка самки осторожными движениями пальцев от головы к хвосту отцедить икру в сухую чашку Петри. Сгустки икры, крови и слизи желательно удалять. В чашку с икрой воду не приливают, поскольку икра в воде быстро теряет способность к оплодотворению. Время подвижности сперматозоидов в воде и, следовательно, фактически их оплодотворяющей способности также ограничено. Поэтому воду к ткани разрушенных семенников приливают только после того, как отцежена икра. Быстро, но тщательно размешав ткань семенников, приливают воду, содержащую сперматозоиды, к икре, находящейся в сухой чашке Петри.

Икру и разведенную сперму в течение минуты или двух осторожно перемешивают кисточкой, пером или просто покачиванием чашки. Затем воду со спермой аккуратно сливают и заполняют чашку Петри свежей отстоянной водой той же температуры. Чашку с осемененной икрой несколько минут покачивают в руках, чтобы икринки, наружная оболочка которых вскоре после попадания в воду становится клейкой, не прилипали ко дну. Иногда приходится несколько раз менять воду и взбалтывать в ней икринки. Хотя в естественных условиях развитие икринок происходит в прикрепленном состоянии, в лабораторных опытах лучше инкубировать свободно плавающую икру, поскольку при отделении приклеившихся ко дну чашки яиц для наблюдений и фиксаций можно их повредить.

Весной, при наступлении нерестовых температур (15 °C и выше), выюны созревают за несколько дней. Для того чтобы нерест не произошел бесконтрольно, самцов и самок надо рассадить по разным аквариумам. Проверяют самок так же, как и после инъекции. У созревших самцов при нажатии на брюшко из полового отверстия струйкой вытекает сперма (самцы «текут»). Таких самцов не вскрывают. Икру, предварительно отцеженную в сухую чашку, просто поливают спермой одного или нескольких самцов, держа их над икрой и несильно нажимая на брюшко. Затем в чашку быстро добавляют воду и осторожно перемешивают половые продукты. Все дальнейшие операции проводят так, как было описано выше.

В одну чашку Петри рекомендуется помещать 300—500 икринок. Вода должна лишь покрывать их. В период инкубации воду необходимо менять по крайней мере раз в сутки, приливая осторожно с краю чашки, так чтобы механическое воздей-

ствие на икринки было минимальным. Воду нужно предварительно отстаивать, ее температура должна совпадать с температурой, при которой идет развитие. В период инкубации надо обязательно удалять погибшие икринки, поскольку они быстро покрываются плесневым грибом сапролегнией и заражают живую икру. Мертвые икринки беловатые, непрозрачные, живые — светложелтые, прозрачные. Отбор мертвой икры производят стеклянной трубочкой с резиновой «грушей» на одном конце.

ПРИЖИЗНЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Оболочки развивающихся яиц вьюна прозрачны, поэтому на протяжении всего эмбрионального развития можно вести прижизненные наблюдения. Для этого достаточно поставить чашку Петри с развивающейся икрой под бинокулярную лупу. Можно также отобрать несколько икринок и рассматривать их, поместив в небольшом количестве воды на часовом стекле. При длительных наблюдениях лучше пользоваться дневным светом или светом стоящей в отдалении сильной лампы, но не лампой осветителя лупы, которая нагревает воду с икринками, что отрицательно сказывается на их последующем развитии.

Прижизненные наблюдения должны обязательно сочетаться с изучением тотальных препаратов и гистологических срезов. Такое комплексное изучение позволит лучше представить целостную картину эмбрионального развития.

Особенно необходимы прижизненные наблюдения на начальном этапе развития, сразу после оплодотворения, когда другие методы наблюдений в условиях лабораторного практикума не рациональны. Речь идет об образовании перивителлинового пространства и формировании бластодиска.

После оплодотворения из периферического слоя ооплазмы под оболочки выделяются осмотически активные вещества. Оболочки в этот период проницаемы и растяжимы, благодаря чему вода под действием осмотических сил проникает через них. Растяжение оболочек и проникновение воды между ними и собственно яйцом приводит к образованию перивителлинового пространства, в жидкости которого и происходит дальнейшее развитие зародыша. В связи с образованием перивителлинового пространства общий объем яйца увеличивается (икринки «набухают»), однако объем собственно яйцеклетки не изменяется. Процесс образования перивителлинового пространства длится у вьюна несколько десятков минут, и его легко наблюдать прижизненно под бинокулярной лупой.

Следует заметить, что перивителлиновое пространство раздуется, правда, медленнее и в неоплодотворенных яйцах спустя некоторое время после попадания их в воду. Спонтанное развитие перивителлинового пространства препятствует опло-

творению яиц, поэтому при искусственном осеменении икру вначале отцеживают в сухую посуду.

Яйцеклетки вьюна (как и большинства костистых рыб) полилецитальные. Большую часть яйца занимают желточные гранулы. Между ними имеются тончайшие прослойки чистой цитоплазмы (ооплазмы), которые не видны в бинокулярной лупе. Кроме того, существует тонкий периферический слой цитоплазмы, несколько утолщенный в районе анимального полюса. После оплодотворения в живой икринке хорошо видны токи цитоплазмы, направляющиеся из разных участков поверхности яйца в сторону анимального полюса. Благодаря этим перемещениям цитоплазмы, ее периферический слой повсюду становится более тонким, а на анимальном полюсе возникает прозрачный цитоплазматический бугорок — бластодиск, или зародышевый диск, заметно возвышающийся над поверхностью яйца. Он хорошо виден к моменту завершения формирования перивителлинового пространства. Бластодиск сохраняет связь с периферическим слоем цитоплазмы по всей своей окружности. Таким образом, несмотря на перераспределение массы ооплазмы, непрерывность ее поверхностного слоя сохраняется.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Морфологию зародышей вьюна на последовательных стадиях развития можно изучать как прижизненно, так и на тотальных и гистологических препаратах.

Для изготовления препаратов зародыши выбранной стадии развития должны быть зафиксированы. Нужно их количество извлекают из чашки Петри пипеткой, диаметр которой не должен намного превышать диаметр икринок. Извлеченные икринки переносят в фиксатор, следя за тем, чтобы при этом в фиксатор попадало возможно меньше воды.

Для приготовления тотальных препаратов икринки можно фиксировать в 4%-ном формалине (9 частей воды на 1 часть продажного формалина); можно использовать и более крепкий формалин, а также жидкость Буэна. В этих фиксаторах они могут храниться неограниченно долго. Перед изготовлением препаратов нужное количество икринок достают из фиксатора пипеткой и переносят в воду для промывания. В это же время с икринок снимают оболочки, для чего каждую из них помещают в капле воды на предметное стекло и проделывают эту операцию двумя остро отточенными препаровальными иглами под бинокулярной лупой. При определенном навыке оболочки можно снять довольно быстро, хотя часть икринок при этом повреждается.

Затем икринки постепенно обезвоживают, последовательно проводя через ряд порций этилового спирта повышающейся концентрации (50—70—96%-ный) и бутиловый спирт, переносят

в ксилол для просветления и, наконец, заключают в бальзам или полистирол.

В каждой из упомянутых сред икринки достаточно подержать 10—15 мин, но можно оставить и надолго (несколько суток). Опыт показал, что в ксилоле они могут находиться даже свыше месяца без ущерба для качества препаратов. Операцию по обезвоживанию и просветлению лучше проводить в плотно закрытых сосудах.

Препараты получаются нагляднее, если икринки предварительно подкрасить квасцовым кармином или квасцовым гематоксилином Бёмера (последний используется также для окраски гистологических препаратов). Для окрашивания икринки переносят из воды в раствор красителя, затем в течение одной минуты снова промывают водой и уже потом проводят через спирты и ксилол.

Для окраски гематоксилином Бёмера икринку кладут на предметное стекло и под контролем бинокулярной лупы наносят сверху каплю красителя (оболочки должны быть уже сняты).

Вначале, примерно через минуту, желток окрашивается более интенсивно, чем зародыш. Оптимальным вариантом можно считать молочно-синюю окраску зародыша, при которой он четко выделяется на фоне темнофиолетового желтка. Нужно смыть краситель водой из пипетки, поскольку дальше зародыш начинает интенсивно окрашиваться, и контрастность пропадает. Следует учитывать, что зародыш заметно потемнеет в процессе дальнейшей обработки. Если нужная степень окраски не достигнута, можно ненадолго нанести еще одну каплю гематоксилина Бёмера, снова смыть ее и т. д.

В растворе квасцового кармина икринки обычно не перекрашиваются. Поэтому держать их в этом красителе можно долго, хотя для окрашивания вполне достаточно нескольких минут.

Окрашенные и просветленные икринки помещают в специально подготовленную на предметном стекле камеру, которая должна предохранить икринку от раздавливания. Стенки камеры можно сделать из спичек, кусочков тонких полиэтиленовых трубочек, бумажных полосок и т. п. Лучше всего заранее приклеить стенки будущей камеры к стеклу силикатным канцелярским клеем или эпоксидной смолой. Чтобы они лучше приклеивались и держались, поверхность стекла желательно сделать шероховатой с помощью точильного круга.

В подготовленную таким образом камеру наливают немного бальзама и переносят туда пипеткой икринки из ксилола. С помощью препаровальных игл икринку ориентируют небольшим полюсом вверх. Икринки часто переворачиваются так, что зародыш плохо виден или не виден вообще. Даже если с самого начала они положены удачно, то могут перевернуться

потом, в процессе загустевания бальзама. Чтобы добиться нужного положения, надо взять небольшую каплю бальзама так, чтобы икринка немного выступала из него, и затем следует оставить ее в таком виде на несколько дней, не накрывая покровным стеклом. За это время бальзам загустеет, а в таком бальзаме положение икринки, если это необходимо, легко изменить препаровальными иглами. После того, как икринка приняла нужное положение, в камеру добавляют свежий бальзам и накрывают ее покровным стеклом.

Камеру можно сделать в форме прямоугольника по размерам покровного стекла и поместить в нее несколько икринок. Для создания замкнутых камер удобны также используемые рыболовами-любителями так называемые заводные кольца. Это небольшие спиральки диаметром около 0,5 см, высота которых немного превышает диаметр икринок выюна. Поскольку покровное стекло слишком велико для такого колечка, лучше накрыть его частью стекла, разломав последнее или разрезав стеклорезом. Можно накрыть одним покровным стеклом сразу четыре расположенных рядом колечка. На одном предметном стекле помещают 12 колечек под тремя покровными стеклами. В таких камерах могут быть зародыши как разных стадий, так и одной стадии развития, но в разных положениях. Когда бальзам затвердеет и покровные стекла прочно приклеются, можно залить свежим бальзамом все промежутки между кольцевыми камерами, чтобы избежать поломки покровного стекла.

Для изготовления непрозрачных препаратов, детали которых иногда лучше видны в падающем свете, предлагается следующая оригинальная методика. Из ксилола икринку переносят в подготовленную для нее камеру и наносят на нее маленькую каплю жидкого полистирола с таким расчетом, чтобы он покрыл ее тонкой пленкой. Излишки полистирола, стекая с икринки, приклеивают ее к стеклу. Полистирол загустевает примерно в течение получаса. При этом на поверхности зародыша образуется матовая корочка. Светлый матовый зародыш рельефно выделяется на фоне желтка, особенно если последний подкрашен. На следующий день препарат можно считать готовым. Сверху камеры приклеивают бальзамом покровное стекло, которое предохранит препарат от повреждений и пыли.

Эффект «рельефности» возникает, если икринка выступает из полистирола, и не проявляется, если она залита полностью. Особенно хорош описанный способ для изготовления препаратов зародышей на ранних стадиях развития: от первых этапов дробления до образования бластулы. Прозрачные и плохо различимые при заливке в бальзам, здесь бластомеры отчетливо видны. Особенно красивые препараты получаются после окраски гематоксилином Бёмера.

Изменить положение икринки при заключении ее в поли-

стирол можно только, пока полистирол не загустел. Иначе придется растворить его ксилолом и заключать препарат вновь.

Прозрачные гранулы полистирола растворяют в ксилоле. Раствор должен быть приблизительно 40%-ным. Обычно его хранят в стеклянной банке с притертой пробкой, а в случае загустения разбавляют ксилолом. В полистирол необходимо добавлять пластификатор — вещество, придающее эластичность полистироловой пленке, повышающее ее клейкость и препятствующее помутнению застывшего полистирола и появлению в нем трещин. Такими пластификаторами являются дибутилсебацат и дибутилфталат. Эти вещества добавляют в количестве 6 мл на 100 мл раствора полистирола в ксилоле.

Для изготовления гистологических препаратов зародышей лучше фиксировать в жидкостях Буэна, Карнуа, Ценкера, Серра. В первой, в отличие от большинства фиксаторов, икришки могут находиться месяцами. Однако во всех случаях рекомендуется возможно скорее (через сутки) залить материал в парафин, поскольку желток яйца при длительном нахождении в фиксаторах становится твердым и хрупким и хуже режется. Кроме того, после длительной фиксации препараты хуже окрашиваются.

Перед проводкой с икринок надо снять оболочки, которые, во-первых, мешают ориентировать зародыша при заливке в парафин, а во-вторых, затрудняют гистологическую обработку.

После фиксации икришки отмывают в воде. Если фиксатором является жидкость Буэна, то минимальное время промывки около получаса. Затем следует проводка в спиртах повышающейся концентрации: 50—60—70—80—90—96%-ный. В каждом из них надо выдерживать материал приблизительно по 15 мин. Передержка в спиртах нежелательна, так как приводит к затвердеванию и увеличению хрупкости желтка. Окончательное обезвоживание происходит в бутиловом спирте, куда икришки можно поместить на 30 мин. Проводку осуществляют в бюксах с крышками.

При резке на микротоме желток часто выкрашивается; его можно сделать менее твердым и ломким, если поместить икришки после бутилового спирта в гвоздичное или целлоидиновое масло на 3—4 сут. Можно отделять зародыш от желтка после фиксации, но это приводит к нарушению некоторых структур и не позволяет представить в комплексе зародышевую и внезародышевую части.

После бутилового спирта или целлоидинового масла икришки на 30 мин переносят в хлороформ, а затем — в хлороформ-парафин, где и оставляют на сутки в термостате при 37°C. Затем их выдерживают в двух порциях чистого парафина по 20 мин в каждой при температуре 56°C и, наконец, погружают в третью порцию чистого парафина, в котором и остужают.

Во избежание уплотнения желтка держать материал в парафине более длительное время не следует.

Для правильной ориентировки зародыша в парафине можно рекомендовать следующий прием. Икринки переносят в бумажную коробочку с расплавленным парафином, которую не остужают, как обычно при заливке, а ставят в чашку Петри с нагретой до кипения водой. Вода в течение некоторого времени не дает остыть парафику. Этого времени достаточно, чтобы иглоочками сориентировать икринки под бинокулярной лупой, но при необходимости горячую воду можно подливать.

Толщина срезов должна быть 7—10 мкм. Чтобы гранулы развивающегося желтка не царапали и не разрывали срез, блок нужно ориентировать так, чтобы нож сперва проходил через сам зародыш, а потом уже через желток. Все же, несмотря на принимаемые меры, хорошие срезы через всю икринку получаются редко.*

Хорошие результаты дает заливка развивающихся икринок вьюна в полиэтиленгликоль после фиксации в жидкостях Буэна и Карнуа, а также в 2,5%-ный глутаральдегид на 0.1 М фосфатном буфере (Дабагян и др.). Хасан Насер Эль-Дин и Н. С. Габаева рекомендуют фиксировать яйца вьюна в диоксане в течение 24 ч, после чего икринки помещать в новую порцию диоксана на 7—9 сут. Затем их переводят в смесь, состоящую из 25 мл диоксана, 5 мл ксилола и 20 мл парафина, в которой выдерживают в течение 15—16 ч в термостате при температуре 59 °С и, наконец, заливают в парафин обычным способом. Диоксан ядовит, и работать с ним можно только в вытяжном шкафу.

Для окрашивания срезов можно рекомендовать гематоксилин Бёмера с эозином, железный гематоксилин Гейденгайна и окраску «азан» по Гейденгайну.

Сроки наступления и длительность отдельных стадий эмбрионального развития при определенных постоянных температурах легко рассчитать при помощи уже упомянутых графика и таблицы, что, однако, не освобождает от визуального контроля за развитием. Точное совпадение расчетных и действительных сроков возможно только при строго постоянной температуре. Здесь мы приведем ориентировочные сроки наступления некоторых «узловых» стадий эмбрионального развития вьюна при температуре 18 °С, считая от момента оплодотворения. При этой температуре формирование бластодиска завершается приблизительно через час (рис. 63, а). Через 6.5—7 ч заканчивается процесс дробления и образуется морула** (рис. 63, с). Стадия бластулы приходится на время от 8 до 12 ч после опло-

* Ряд методик, позволяющих добиться хороших результатов при изготовлении срезов яиц костистых рыб, приводит Т. А. Детлаф [1974].

** Термин неточен (см. ниже), но широко используется в ихтиологической литературе.

дотворения (рис. 64, *а*). Гастрюляция начинается через 16 ч (стадия зародышевого узелка — рис. 64, *в*) и продолжается приблизительно 11 ч (на рис. 64, *г* показана одна из завершающих стадий гастрюляции). Первая пара туловищных сомитов появляется через 28 ч, 20-я пара — через 41,5 ч (рис. 64, *д*). Обособление хвостового отдела можно наблюдать через 44 ч после оплодотворения (рис. 64, *е*), вылупление — приблизительно через 67 ч (рис. 64, *ж*).

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Яйцо после оплодотворения, образование бластодиска (тотальный препарат). Зародышей этой стадии развития лучше всего заключать в бальзам, предварительно окрасив. Надо лишь следить за тем, чтобы бластодиск не перекрасился, а оставался прозрачным на фоне темного, непрозрачного желтка. Бластодиск образуется в результате концентрации активной цитоплазмы у анимального полюса (рис. 63, *а*). В дальнейшем именно из материала бластодиска формируется зародыш.

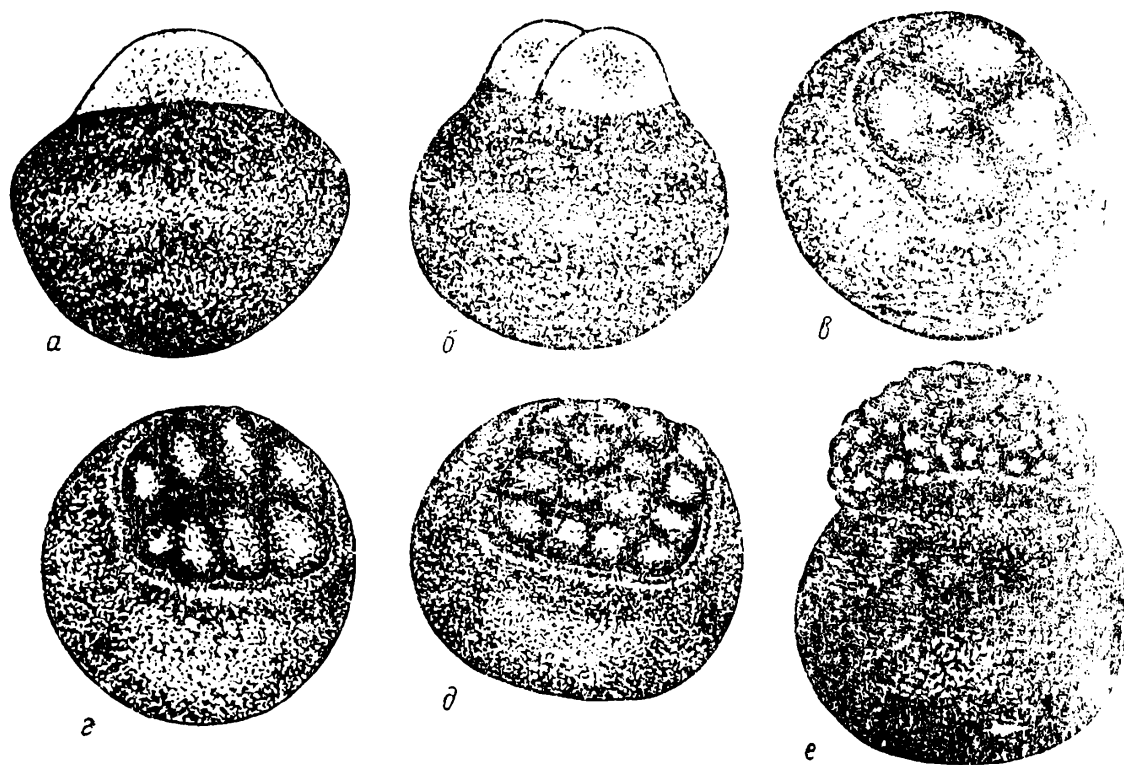


Рис. 63. Внешний вид зародышей вьюна в период дробления.

а — появление бластодиска, *б* — 2 бластомера, *в* — 4, *г* — 8 и *д* — 16 бластомеров морула.

Ранние стадии дробления (тотальные препараты). Стадии дробления удобно изучать на тотальных препаратах зародышей, заключенных как в полистирол, так и в бальзам, но заливка в полистирол предпочтительнее, поскольку зародыши получают непрозрачными, контрастными и более рельефными.

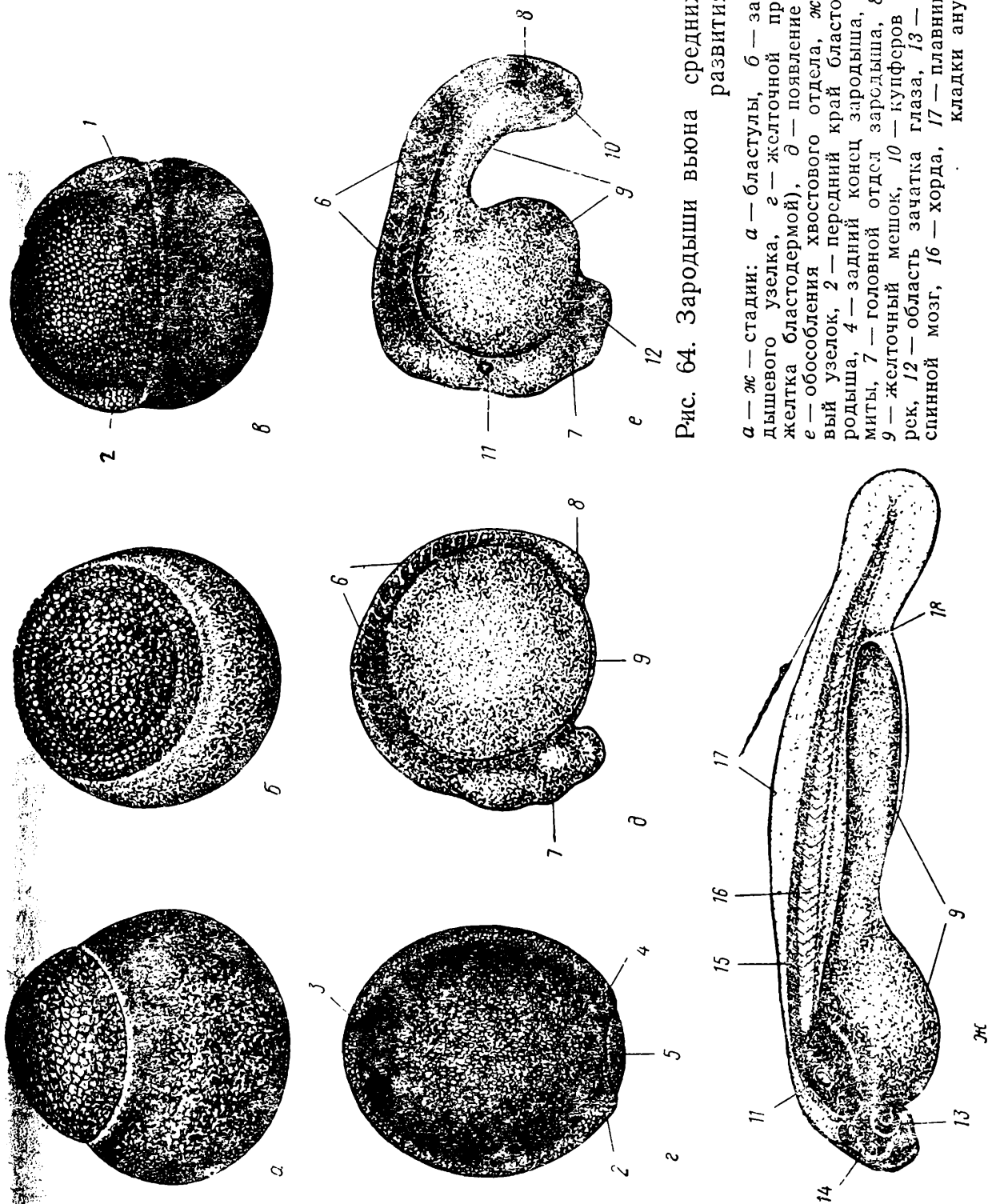


Рис. 64. Зародыши вьюна средних и завершающих стадий развития.

а — ж — стадии: а — бластулы, б — зародышеского кольца, в — зародышевого узелка, г — желточной пробки (завершение обрастания желтка бластодермой), д — появление 20 пар туловищных сомитов, е — обособления хвостового отдела, ж — выплывания; 1 — зародышевый узелок, 2 — передний край бластодиска, 3 — передний конец зародыша, 4 — задний конец зародыша, 5 — желточной пробка, 6 — сомиты, 7 — головной отдел зародыша, 8 — хвостовой отдел зародыша, 9 — желточный мешок, 10 — купферов пузырек, 11 — слуховой пузырек, 12 — область зачатка глаза, 13 — глаз, 14 — головной мозг, 15 — спинной мозг, 16 — хорда, 17 — плавниковая кайма, 18 — область закладки ануса.

Дробление яйца вьюна, как и у других костистых рыб, происходит по меробластическому (дискоидальному) типу, при котором делится бластодиск. Образующиеся при дроблении бластомеры вплоть до четвертого деления отделены друг от друга глубокими бороздами, но своими основаниями переходят в слой цитоплазмы, подстилающей бластодиск, и в тонкий цитоплазматический слой, одевающий желток с поверхности. Поэтому с нижней стороны связь между бластомерами фактически сохраняется.

Первые четыре деления проходят в меридиональной плоскости, бластодиск при этом разделяется на 2, 4, 8 и 16 клеток, которые при заливке в полистирол выглядят как светлые бугорки на поверхности

темноокрашенного желтка (рис. 63, б—д). Ядра бластомеров на тотальных препаратах не видны.

Стадия 16 бластомеров (меридиональный разрез). В меридиональный разрез на этой стадии дробления обычно попадает 4 бластомера (их ядра могут в срез и не попасть, как это показано на рис. 65, а). Хорошо видно, что основания клеток не ограничены от подстилающего их слоя цитоплазмы. Таким образом, на этой стадии бластомеры еще образуют единый комплекс с цитоплазматическим слоем, одевающим все яйцо, и сеть цитоплазматических прослоек, пронизывающих желток. Последние плохо различаются в плотной массе крупных интенсивно окрашивающихся желточных гранул. Небольшое количество более мелких гранул

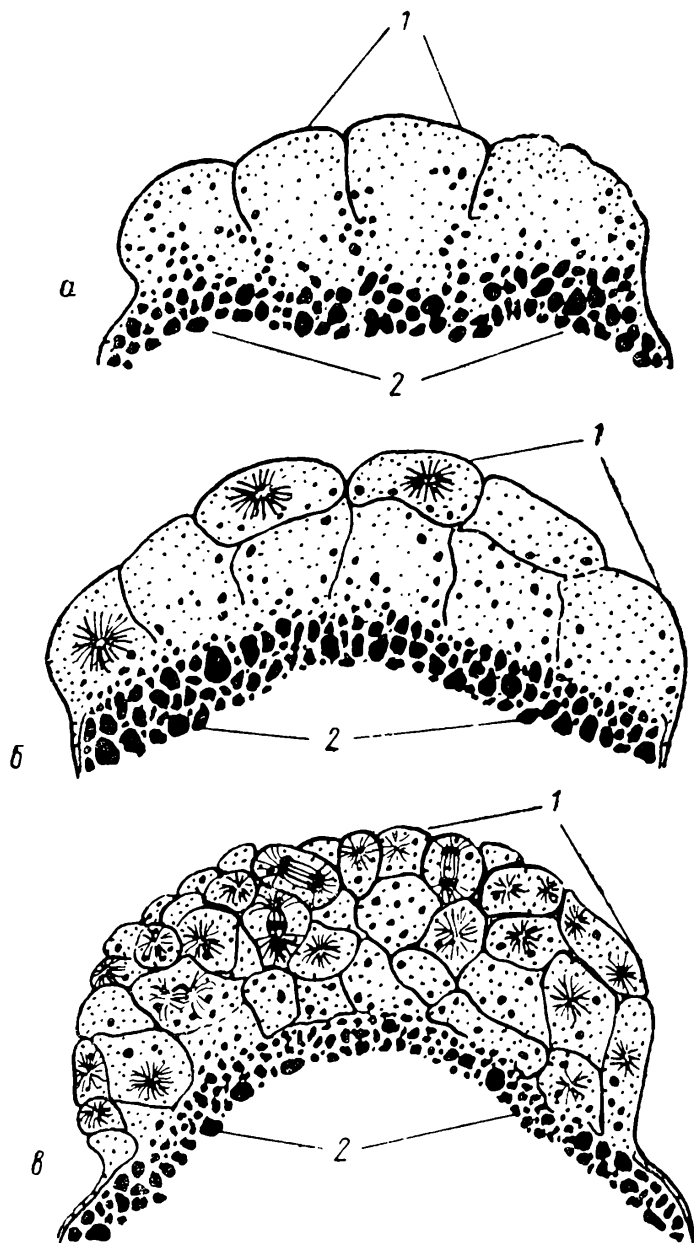


Рис. 65. Меридиональные разрезы зародышей вьюна на стадиях дробления. Ув. 7×8 .

а — 16 и б — 32 бластомера, в — морула; 1 — бластомеры, 2 — желточные гранулы.

Желтка встречается и в цитоплазме бластомеров. На самой поверхности бластомеров часто можно видеть небольшие вакуоли. Они описаны в литературе, но их роль и природа неизвестны.

Стадия 32 бластомеров (меридиональный разрез). Так как начиная с пятого, еще синхронного деления бластомеры делятся в тангентальной (параллельной поверхности яйца) плоскости, то на срезе через бластодиск на стадии 32 бластомеров уже различаются два слоя: поверхностный, состоящий из полностью обособленных клеток, и более глубокий, где клетки сохраняют связь с цитоплазматическим слоем. В клетках могут быть видны митотические фигуры и мелкие гранулы желтка (рис. 65, б).

Стадия морулы (меридиональный разрез). В процессе последующего деления количество клеток, составляющих бластодиск, значительно увеличивается. На срезе через зародыш, находящийся на стадии 256 бластомеров, можно видеть, что большая часть клеток уже полностью утратила связь с желтком (рис. 65, в). Они имеют неправильную многоугольную форму и тесно прижаты друг к другу так, что между ними нет промежутков. В советской ихтиологической литературе для обозначения этой стадии очень часто применяется термин «морула», хотя, по существу, речь идет о начальных этапах формирования дискобластулы. Ввиду внешнего сходства описанной стадии с настоящей морулой можно условно использовать этот термин, учитывая сделанную выше оговорку.

Стадия морулы (тотальный препарат). При изготовлении тотальных препаратов этой стадии развития лучше заключать икринки в полистирол, но хорошо окрашенные препараты можно заключать и в бальзам. Бластодиск на стадии морулы внешне напоминает шапочку, состоящую из нескольких рядов бластомеров (см. рис. 63, е).

Стадия бластулы (меридиональный разрез). По мере деления и увеличения числа клеток их расположение становится более рыхлым, между ними появляются промежутки. Эту стадию называют бластомерной бластулой. Как видно на меридиональном срезе (рис. 66, а), на стадии бластулы начинается дифференциация клеток. На поверхности бластодиска различается эпителизированный слой сильно уплощенных клеток — перидерма. Это чисто эмбриональное образование, которому приписывают защитную функцию. Клетки перидермы обычно окрашиваются интенсивнее остальных.

В основании бластодиска виден довольно толстый слой цитоплазмы, в котором рассеяны крупные ядра неправильной формы. Этот симпластический слой, называемый парабластом, возникает в результате не сопровождаемого цитотомией деления ядер базальных бластомеров, сохраняющих связь с желтком. Он соответствует желточной энтодерме и выполняет трофическую функцию, расщепляя и переводя в усвояемое зародыш.

дышем состояние вещества, содержащиеся в желтке. Парабласт по краям непосредственно переходит в слой цитоплазмы, одевающий с поверхности желтск. В некоторых blastomeres видны гранулы желтка. В отдельных клетках встречаются митотические фигуры (рис. 66, а).

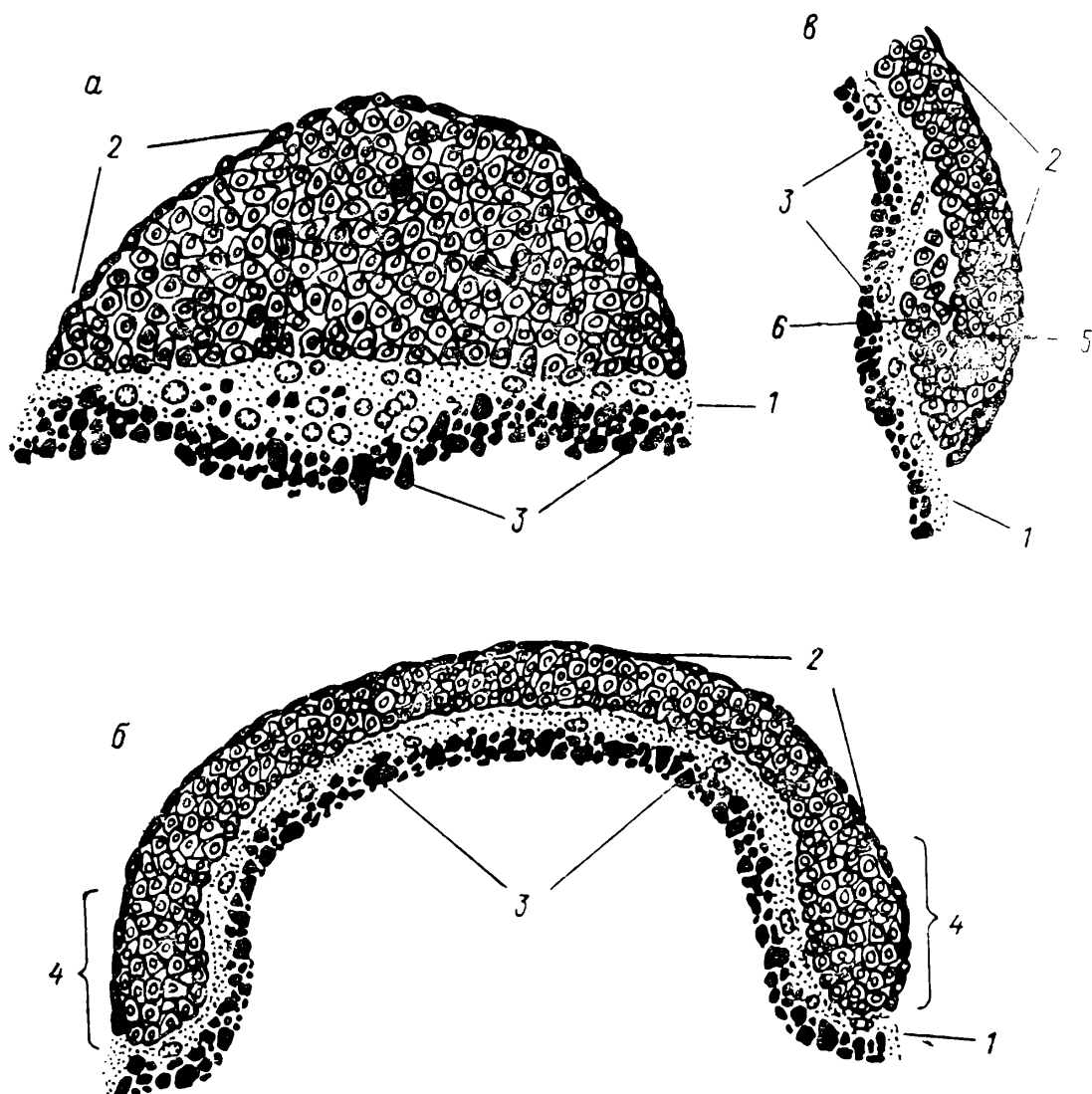


Рис. 66. Разрезы зародышей вьюна на предгастрюляционных стадиях и стадии начала гастрюляции. Ув. 7×8.

а — бластула, б — зародышевое кольцо, в — зародышевый узелок (сагиттальный разрез); 1 — парабласт, 2 — перидерма, 3 — желточные гранулы, 4 — утолщения на ферии бластодиска (зародышевое кольцо), 5 — эпипласт, 6 — гипобласт.

Стадия бластулы (тотальный препарат). Зародыши на стадии бластулы можно заключать как в полистирол, так и в бальзам. В последнем случае толщина клеток бластодиска полупрозрачна, и можно видеть очертания его краев на противоположной стороне икринки (см. рис. 64, а). Бластодиск на стадии бластулы напоминает высокий колпачек из мелких клеток на анимальном полушарии яйца. Позднее он начинает обрастать желток и несколько уплощается.

Стадия зародышевого кольца (тотальный препарат). Икринки на этой стадии следует заливать в бальзам. Края бласто-

блестка, обрастающего желток, слабо утолщены, тогда как его центральная часть становится тонкой и прозрачной. Если смотреть на бластодиск сверху, то его непрозрачное краевое утолщение выглядит как кольцевой валик (см. рис. 64, б), почему и называется зародышевым кольцом. Классический вид кольцо имеет у лососевых рыб, а у вьюна выражено сравнительно слабо. Клетки бластодиска на этой стадии довольно мелкие, но при увеличении бинокулярной лупы их границы можно рассмотреть.

Стадия зародышевого кольца (меридиональный разрез). На этом препарате хорошо видны краевые утолщения бластодиска. Промежутки между клетками бластодиска постепенно исчезают, и он приобретает характер сплошного клеточного пласта, покрытого с поверхности слоем перидермы. Между бластодиском и парабластом имеется узкая щель. Парабласт и находящийся на его поверхности бластодиск в процессе совместного обрастания желтка сильно сдавливают его. Край обрастания врезается в желточную массу, глубоко погружаясь в нее, в результате чего часть желтка вытесняется в сторону анимального полюса (рис. 66, б).

Стадия зародышевого узелка (тотальный препарат). Икринки на этой стадии следует заключать в бальзам. На начальных этапах обрастания желтка начинаются и процессы гастрюляции. Внешне это выражается в появлении в зародышевом кольце утолщения — зародышевого узелка, положение которого соответствует заднему краю бластодиска. Зародышевый узелок виден только при рассмотрении зародыша в профиль. При хорошей окраске и удачном положении икринки можно заметить, что узелок продольно расщеплен на два слоя (рис. 64, в).

Стадия зародышевого узелка (сагиттальный разрез). Ориентация икринок при заливке в парафин зародышей этой стадии очень трудна. Приходится готовить срезы с нескольких икринок в надежде на то, что одна из них сориентирована удачно.

На стадии зародышевого узелка начинаются процессы образования зародышевых листков. Согласно представлениям Пастельса [Pasteels, 1936], гастрюляция происходит путем подворачивания хордальной пластинки и мезодермальных полюсов через верхнюю губу бластопора, что, несмотря на ряд существенных различий, сближает тип гастрюляции у костистых рыб с таковым у осетровых и амфибий. Внутренний слой клеток — гипобласт, с этой точки зрения, представлен материалом, подвернувшимся с поверхности бластодиска. Согласно той же точке зрения подворачивание происходит и по краям бластодиска, причем подвернувшийся в этих участках материал, так же как и у амфибий, участвует в образовании желточных кровеносных сосудов.

Экспериментальные данные, полученные Боллардом на ра-

дужной форели, заставляют пересмотреть наши представления о гастрюляции у костистых рыб. Согласно Болларду, на предгастрюляционной стадии материал нервной, хордальной и энтодермальной пластинок уже располагается в бластодиске сверху вниз в той же последовательности. В начале гастрюляции эти зачатки только концентрируются в области зародышевого узелка, после чего происходит его расщепление (деляминация) на эпи- и гипобласт, а затем вытягивание зачатков.

Мезодермальный материал, по Болларду, мигрирует на периферию бластодиска, где образует утолщение — зародышевое кольцо. Отщепляясь от поверхностных клеток бластодиска, материал мезодермы формирует гипобласт и в процессе обраспания желтка передвигается вместе с бластодиском по поверхности желточной массы. Одновременно мезодермальный материал направляется двумя потоками вдоль зародышевого кольца к заднему краю бластодиска. Здесь он по мере вытягивания хордального материала ложится по бокам от него в виде двух мезодермальных полосок. Согласно Болларду, подворачивание в процессе гастрюляции у костистых рыб вообще не имеет места.

На сагиттальных срезах через зародыш на стадии зародышевого узелка расщепление последнего на внутренний и наружный слои — гипобласт и эпибласт — выражено отчетливо (рис. 66, в). Клетки гипобласта отличаются от клеток эпибласта и других клеток бластодиска более рыхлым расположением.

Стадия зародышевого язычка (сагиттальный разрез). Эпнболическая активность бластодиска приводит к тому, что он постепенно покрывает все большую поверхность желточной массы. Вместе с бластодиском распространяется по поверхности желтка и зародыш, который, вытягиваясь, приобретает вид удлиненной полоски — зародышевого язычка. Передняя часть язычка, находящаяся в том месте, где возник зародышевый узелок, соответствует головному отделу зародыша, тогда как все время удлиняющаяся задняя часть язычка соответствует заднему отделу.

На сагиттальном срезе через зародыш видно, что язычок продольно расщеплен на эпи- и гипобласт (рис. 67, а). Впоследствии из эпибласта развиваются нервная пластинка и эктодерма, из гипобласта — хордальная и энтодермальная пластинки. Клеточный материал последней отщепляется с нижней стороны гипобласта, обращенной к парабласту. Зародышевое кольцо, сохраняющееся вплоть до конца гастрюляции, также состоит из двух слоев: эпи- и гипобласта. Эти слои видны в переднем несколько утолщенном крае бластодиска, но при других направлениях среза мы увидели бы их в любом участке зародышевого кольца.

Между бластодиском и парабластом имеется сравнительно

узкая щель. Парабласт и перидерма, обрастая желточную массу, в своем движении по ее поверхности несколько обгоняют бластодиск, что хорошо видно на препаратах (рис. 67, а). Бластодиск под покровом перидермы распространяется только по поверхности парабласти, который выполняет при этом роль субстрата.

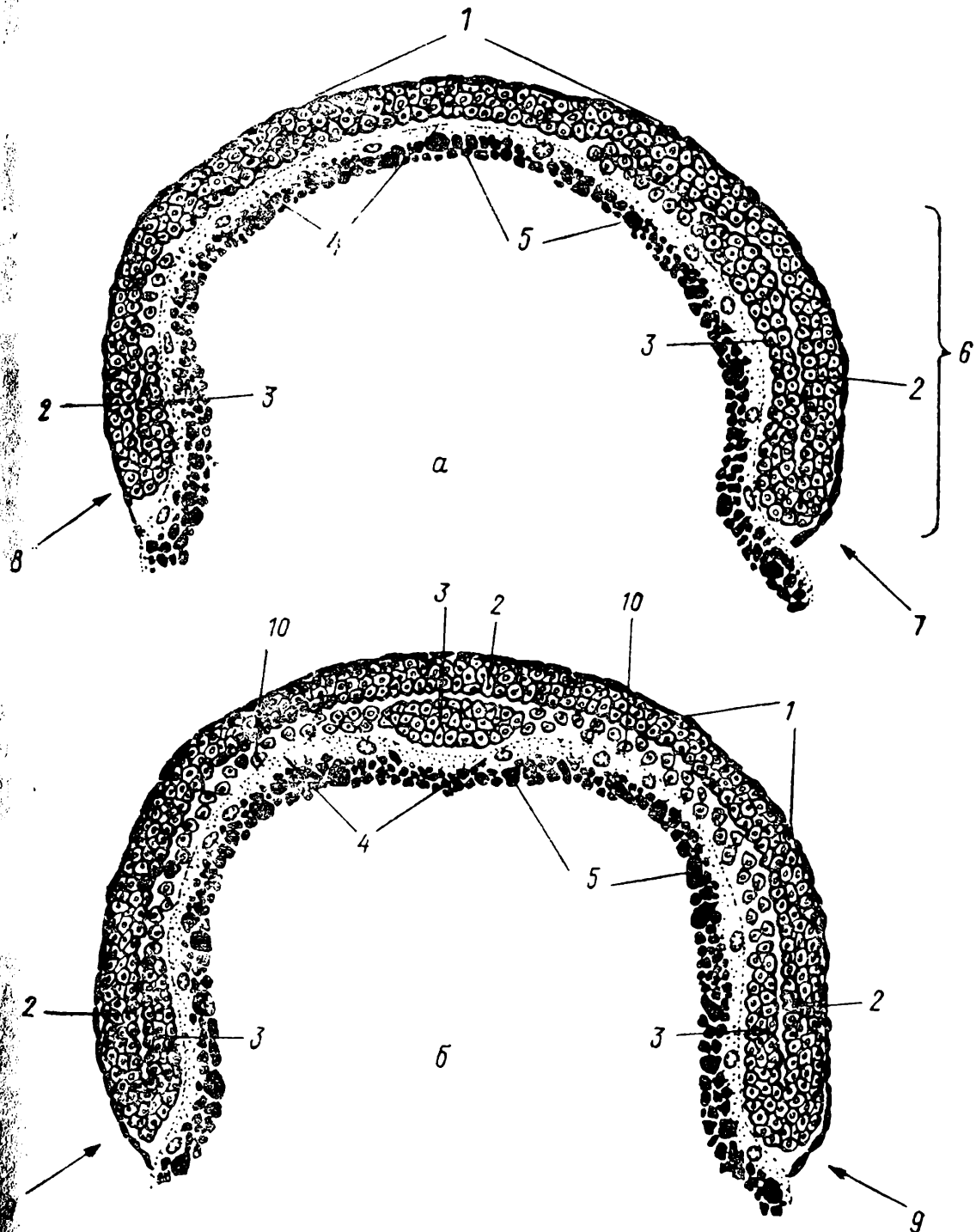


Рис. 67. Разрезы зародышей выюна на стадии гастрюляции (зародышевый язычок). Ув. 7×8.

а — сагиттальный разрез, б — поперечный разрез; 1 — перидерма, 2 — эпибласт, 3 — глотка, 4 — парабласт, 5 — желточные гранулы, 6 — зародышевый язычок, 7 — задний край, 8 — передний край бластодиска, 9 — боковые края бластодиска, 10 — клетки мезодермы.

Стадия зародышевого язычка (поперечный разрез). На поперечном разрезе в области язычка вновь можно видеть эпигипобласт. По бокам от гипобласта видны мезодермальные полосы, состоящие из рыхло лежащих клеток, еще не образующих сплошные пласты (рис. 67, б). В поперечный разрез попадают боковые края бластодиска, и можно убедиться, что зародышевое кольцо по всей периферии двуслойно. На поперечном срезе так же, как и на сагиттальном, видно, что парабласт и перидерма несколько обгоняют бластодиск в обрастании желтка.

Стадия, близкая к завершению обрастания желтка бластодермой (стадия желточной пробки, тотальный препарат). Зародыши этой стадии следует заключать в бальзам. К концу процесса обрастания бластодиском желточной массы оставшаяся свободной часть желтка приобретает вид желточной пробки (см. рис. 64, г), размеры которой сокращаются, пока она совсем не исчезнет. На завершающем этапе обрастания желтка зачатки осевых органов распластаны на его поверхности и видны плохо. С некоторым трудом можно рассмотреть передний конец будущего зародыша — по просвечивающему переднему концу язычка (см. рис. 64, г). Задний конец зародыша находится в области края обрастания. Длина зародыша несколько меньше длины половины окружности икринки по меридиану.

Стадия полного обрастания желтка бластодермой (стадия закрытия желточной пробки, поперечный разрез). В момент зарастания желточной пробки гастрюляция заканчивается и начинается активный процесс дифференциации осевых органов. В этом отношении выюн отличается от лососевых рыб, у которых осевые органы к моменту закрытия желточной пробки уже сформированы.

На поперечном разрезе зародыша описываемой стадии виден плотный, уплощенный хордальный тяж. Нервная пластинка представляет собой слегка утолщенную полосу над хордальным тяжом, края которой сливаются с окружающей эктодермой. Мезодермальные пластинки, состоящие из двух рядов клеток, плотно прилегающих друг к другу, отделены от хордального тяжа. Их края, обращенные к нему, несколько утолщены. Хордальный тяж и начальные участки мезодермальных полос подстилает тонкая энтодермальная пластинка. Ее плоские клетки обычно расположены в один ряд, реже — в два. Перидерма очень тонким слоем одевает зародыш с поверхности (рис. 68, а).

Стадия сегментации мезодермы в переднем отделе туловища (поперечный разрез). Вскоре после закрытия желточной пробки начинается дифференциация мезодермы. Мезодермальные полосы сильно утолщаются в спинной своей части (прилегающей к хорде). Утолщенная часть мезодермальных полос

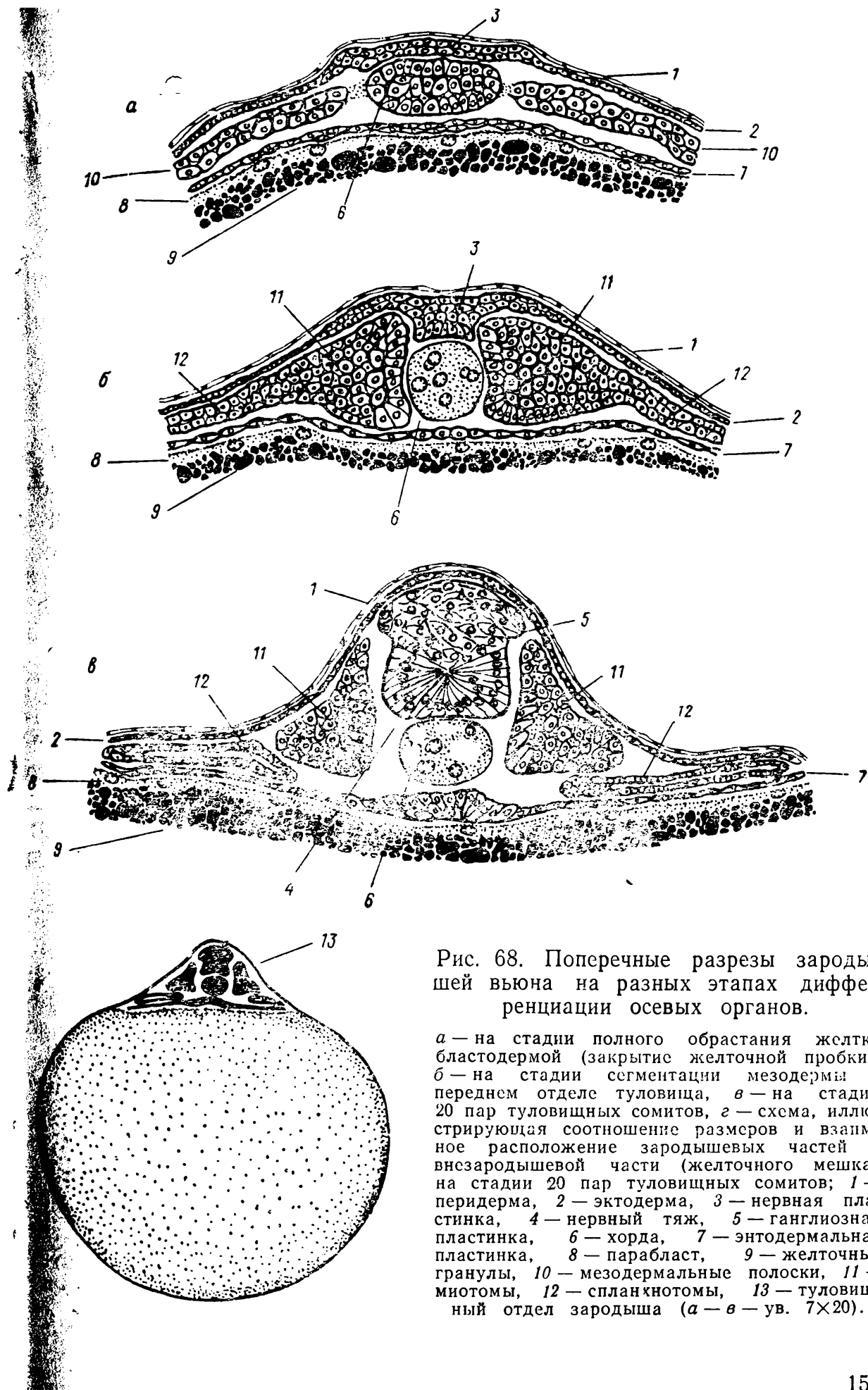


Рис. 68. Поперечные разрезы зародышей вьюна на разных этапах дифференциации осевых органов.

а — на стадии полного обрастания желтка бластодермой (закрытие желточной пробки), *б* — на стадии сегментации мезодермы в переднем отделе туловища, *в* — на стадии 20 пар туловищных сомитов, *г* — схема, иллюстрирующая соотношение размеров и взаимное расположение зародышевых частей и внезародышевой части (желточного мешка) на стадии 20 пар туловищных сомитов; 1 — перидерма, 2 — эктодерма, 3 — нервная пластинка, 4 — нервный тяж, 5 — ганглиозная пластинка, 6 — хорда, 7 — энтодермальная пластинка, 8 — парабласт, 9 — желточные гранулы, 10 — мезодермальные полосы, 11 — миотомы, 12 — спланхотомы, 13 — туловищный отдел зародыша (*а* — *в* — ув. 7×20).

сок сегментируется. Этот процесс начинается в передней части туловищного отдела и постепенно распространяется назад. Сегментированные участки мезодермальных пластин представляют собой миотомы, несегментированные — спланхнотомы.

На поперечном срезе через зародыш на этой стадии хорда имеет округлые очертания. Ядра в хордальном тяже видны хорошо, но клеточные границы не различимы. К хорде с обеих сторон плотно прилегают миотомы. Спланхнотомы еще не отделены от миотомов и представляют собой плоские двуслойные пластинки (рис. 68, б).

Нервная пластинка в срединной своей части утолщена и вытянута в высоту. Снизу и с боков к ней прилегают миотомы. Дорсолатеральные части нервной пластинки, переходящие в эктодерму, остаются уплощенными. Клетки нервной пластинки имеют полигональную форму (рис. 68, б). У костистых рыб на участке нервной пластинки, соответствующем будущему спинному мозгу, не образуется четких нервных валиков, и спинной мозг (в отличие от головного) закладывается как плотное образование, полость в котором возникает позже в результате расхождения клеток.

Энтодермальная пластинка подстилает хорду, миотомы и дорсальную часть спланхнотомов. Она по-прежнему состоит из уплощенных клеток, расположенных в один, изредка в два ряда.

Стадия 20 пар туловищных сомитов (тотальный препарат). На тотальных препаратах зародышей этой стадии, фиксированных формалином, сомиты практически не видны. Поэтому рекомендуется фиксация в жидкости Буэна, которая не только уплотняет ткани, но и окрашивает их в желтый цвет. После обычной проводки неокрашенные зародыши можно заключать в бальзам. Обычно миотомы трудно рассмотреть из-за тонкого покровного слоя перидермы и эктодермы, который после фиксации отстает и сморщивается. Если остро отточенными иглами снять этот покровный слой, то обнажившиеся сомиты видны лучше, и их легко подсчитать. В этом случае можно заключить зародыши и в полистирол. Однако операция по снятию покровного слоя трудна и часто приводит к повреждению зародыша.

После образования 10 пар туловищных сомитов увеличивается интенсивность роста головного отдела, хотя его дифференцировка начинается раньше. Головной отдел приподнимается над желтком и отчасти выдвигается вперед. В то же время хвостовая почка, образовавшаяся после закрытия желточной пробки, также несколько приподнимается над желтком, но не отделяется от него, а растет все далее по окружности желтка в направлении к головному отделу. Благодаря этому процессу к стадии 20 пар туловищных сомитов головной и хвостовой отделы сближаются, и зародыш оказывается сильно изогнутым.

м. рис. 64, д). Миотомы имеют форму буквы V с очень тупым углом, который обращен в сторону головного отдела.

Стадия 20 пар туловищных сомитов (поперечный разрез через зародыш в передней части туловищного отдела). По мере того, как сегментация миотомов распространяется все далее назад, в передней части туловищного отдела продолжается дифференциация зачатков осевых органов.

На этом препарате хорда имеет овальные или округлые очертания. Начинается процесс ее вакуолизации (рис. 68, в). Спланхнотомы отделены от миотомов. Внутри спланхнотомов имеются щелевидные полости, клетки их уплощены. Миотомы представляют собой вытянутые в высоту образования. На некоторых срезах в них видны небольшие полости. Дифференциация миотомов выражена пока слабо, хотя клетки отдельных их участков различаются по форме, высоте, интенсивности окраски и другими особенностями.

Нервная пластинка преобразуется в нервный тяж, лишенный полости, хотя удлиненные клетки тяжа на поперечном срезе часто расположены радиально вокруг некоего центра, где впоследствии должна возникнуть полость. На спинной стороне нервного тяжа имеется утолщение, соответствующее ганглиозной пластинке.

Энтодермальная пластинка на этой стадии развития зародыша вьюна утолщена в средней части, благодаря чему приобретает треугольную форму. Просвета в ней пока еще нет (рис. 68, в).

Уплощенные клетки эктодермы зародыша лежат в один ряд и переходят непосредственно в слой везародышевой эктодермы, окружающей желточный мешок. Перидерма по-прежнему одевает зародыш с поверхности. Ее клетки также сильно уплощены. Они несколько меньше эктодермальных клеток и темнее окрашены. На этой стадии парабласт все еще хорошо виден (рис. 68, в). Зародышевый валик заметно приподнят над желточным мешком, что хорошо видно на поперечном срезе (рис. 68, г).

Стадия обособления хвостового отдела (тотальный препарат). Окрашенные или неокрашенные зародыши этой стадии после фиксации в формалине заключают в бальзам.

Обособление хвостового отдела наблюдается при появлении 25—26 пар туловищных сомитов. Хвостовой отдел выпрямляется, растягивая при этом желточный мешок, так что последний приобретает вырост, сопровождающий весь задний отдел зародыша, и в целом имеет форму реторты. Головной отдел, прилегающий к расширенной части «реторты», сильно изогнут (рис. 64, е). Подобная морфология зародыша характерна на определенном этапе и для других рыб отряда карпообразных. На этой стадии зародыши вьюна начинают двигаться внутри яйцевых оболочек.

На тотальных препаратах зародышей видны туловищные сомиты. Хвостовая мезодерма еще не сегментирована. Слабо просвечивает зачаток глаза, иногда различим слуховой пузырек. Всегда виден купферов пузырек, который гомологизируют с нервно-кишечным каналом. Он находится в хвостовой области, в некотором отдалении от заднего края желточного мешка (рис. 64, е).

Стадия вылупления (тотальный препарат). Окрашенные и неокрашенные зародыши этой стадии после фиксации формалином можно заключать как в бальзам, так и в полистирол, в зависимости от того, какие детали надо лучше рассмотреть.

У вылупившихся зародышей на нижней поверхности головы имеется орган, с помощью которого в природных условиях они прикрепляются к водным растениям и висят некоторое время головой вверх. Сердце вылупившихся зародышей уже пульсирует, но кровь у них бесцветная.

К моменту вылупления зародыш выпрямляется. Длина его увеличивается, тогда как размеры грушевидного желточного мешка уменьшаются. Плавниковая кайма тянется по спинной стороне зародыша примерно от уровня первых туловищных сомитов, огибает хвостовой отдел, идет по брюшной стороне вдоль суженной части желточного мешка, образуя лишь очень небольшую выемку в области закладки ануса, находящейся возле заднего конца желточного мешка (см. рис. 64, ж). На этой стадии сегментация хвостового отдела близка к завершению.

При заключении в бальзам у зародышей хорошо видны глаза, в которых еще отсутствует пигмент, основные отделы головного мозга (передний, средний, задний мозг, закладка мозжечка) и спинной мозг, проходящий темной полосой по спинной стороне тела. Под ним тянется широкая и светлая полость хорды (см. рис. 64, ж). Спинной мозг и хорда просвечивают под закрывающими их с боков сомитами, но сами сомиты плохо различимы. Гораздо лучше они видны при заключении зародыша в полистирол, но тело его при этом становится непрозрачным. В то же время при заливке в полистирол четко выявляется область слухового пузырька, который не всегда удается найти на препаратах, заключенных в бальзам (см. рис. 64, ж).

После выхода зародыша из оболочек процесс морфологической перестройки организма продолжается. Вылупившиеся зародыши костистых рыб, в том числе и выюна, не похожи на взрослых особей. После вылупления начинается период личиночного развития, который у некоторых рыб бывает весьма длительным.

АМФИБИИ

ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ
И ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

С развитием амфибий можно познакомиться на примере травяной лягушки, *Rana temporaria*. Разработка методов получения развивающейся икры вне сезона естественного размножения, простота содержания и выращивания личинок делают ее удобным лабораторным объектом. *Rana temporaria* живет в Европе, южная граница ареала — на широте средней Волги, а северная — за полярным кругом, встречается и в Зауралье. Для экспериментально-эмбриологических исследований используют также озерную лягушку — *Rana ridibunda*, которая распространена в центральных и южных областях Европейской части СССР, на Кавказе, в Средней Азии.

В период икрометания лягушки собираются в водоемы в больших количествах. Размножение лягушек в окрестностях Ленинграда обычно происходит в конце апреля — начале мая, под Москвой — в марте — апреле, под Киевом — в конце февраля — начале марта. Началу икрометания предшествует спаривание самцов и самок, в таком состоянии они находятся довольно долго, а затем в течение короткого срока самка мечет икру, а самец поливает икру спермой. Кладка икры у *Rana temporaria* имеет вид слизистого комка диаметром до 30 см. Кладка опускается на дно, и примерно через 2 ч, когда оболочки яиц набухают, всплывает. Сбор икры в природе не требует никаких специальных навыков, следует только не пропустить сроки наступления икрометания. Для получения икры на ранних стадиях развития нужно брать еще малонабухшие кладки. Однако обычно поступают иначе — ловят спаренных лягушек, разнимают их и уже в лаборатории сажают самку и самца в один аквариум, где они снова спариваются и откладывают икру, или забивают самку и самца и проводят искусственное осеменение.

В лабораторных условиях можно работать с ооцитами и за-

родышами травяной лягушки в течение всего осенне-зимнего периода. У взрослых самок с начала осени и до весны яичники занимают большую часть полости тела и содержат множество крупных ооцитов, достигших окончательных размеров и закончивших процесс формирования желтка. Для того чтобы вызвать преждевременное созревание ооцитов, самки инъецируют суспензию гипофизов, которые можно брать как от самок, так и от самцов.

Взрослым лягушкам отрезают верхнюю часть головы (без нижней челюсти) за барабанными перепонками. Обездвиживают животное, разрушая спинной мозг. Голову промывают, удаляя всю кровь. Отгибая слизистую оболочку, покрывающую небо, обнажают основание черепа. В центре расположена парасфеноидная кость, имеющая крестообразную форму (рис. 69). Нередко гипофиз просвечивает через центральную

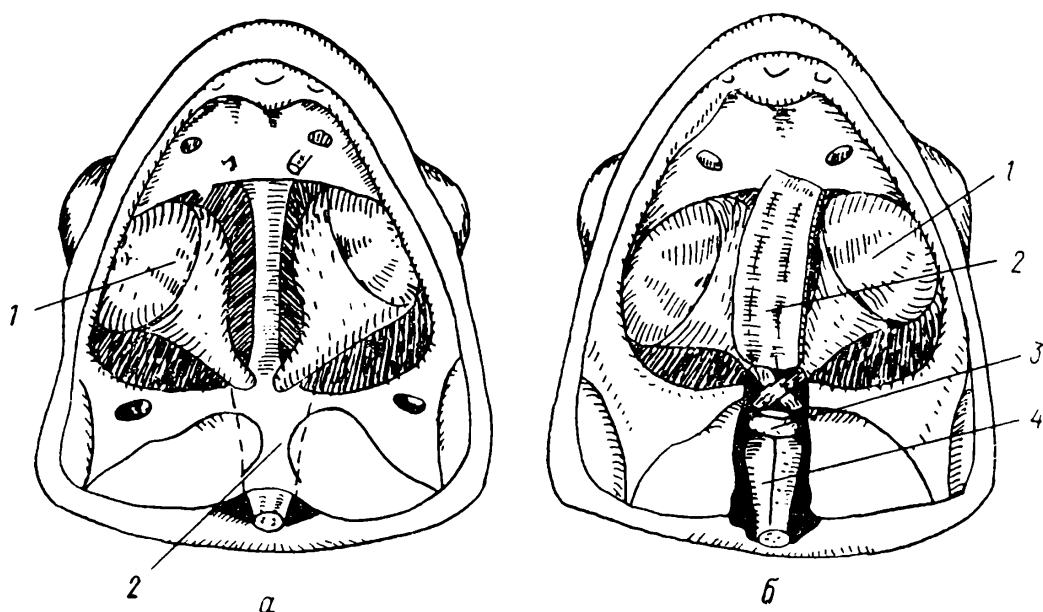


Рис. 69. Схема гипофизэктомии [Гамбургер, 1947, из «Объектов биологии развития», 1975].

а — голова лягушки (вид с брюшной стороны), нижняя челюсть удалена, *б* — мозг и гипофиз обнажены; 1 — глаз, 2 — парасфеноидная кость, 3 — гипофиз, 4 — продолговатый мозг.

часть парасфеноида. Острыми маленькими ножницами перерезают задний и боковые отростки парасфеноида (введя ножницы в спинномозговой канал, делают разрезы по направлению к глазам) и тонким пинцетом отгибают кпереди центральную часть кости. При этом обнажается гипофиз, который обычно хорошо заметен благодаря розовой окраске. Его извлекают и растирают в ступке в $0,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора (0,65% NaCl).

Так как содержание лютеинизирующего гормона в гипофизе постепенно нарастает от осени к весне, а чувствительность яичников лягушек к этому гормону также повышается по мере приближения срока их естественного размножения, то чем ближе

же к весне, тем меньшее количество гипофизов может вызвать полноценную реакцию овуляции у травяной лягушки. Можно рекомендовать следующие количества гипофизов для инъектирования одной самки *Rana temporaria*: в октябре-декабре — 6 гипофизов, в январе-феврале — 4, в марте — инъекция 2, в апреле можно инъектировать один гипофиз. В октябре-феврале при необходимости инъектировать одной самке 4—6 гипофизов инъекции следует делать несколько раз (2—3 раза), вводя одновременно материал 2 гипофизов через день. При работе с *Rana ridibunda* для одной инъекции берут 4—5 гипофизов, количество инъекций то же, что и для *Rana temporaria*. Суспензию гипофизов вводят подкожно в спинной (или брюшной) лимфатический мешок. Инъектируемую самку удобнее держать в левой руке и вводить иглу шприца через кожу на боку. Иглу направляют вперед под кожу, чтобы не повредить внутренние органы. После инъекции иглу осторожно удаляют, прижав кожу в месте входа иглы, и, производя «массаж» от прокола вперед и в стороны, чтобы избежать выхода гипофизарного материала. Для получения хороших результатов для инъектирования лучше брать самок среднего размера, а в качестве доноров гипофизов — самых крупных лягушек. Самку помещают в банку с небольшим количеством воды с указанием даты и инъектированной дозы. Желательно держать самок в прохладном месте, при температуре не выше 18°C. Воду в банках следует менять не реже одного раза в два дня.

Во время овуляции ооциты из открывшихся фолликулов попадают в полость тела, где благодаря движениям ресничек мерцательного эпителия перемещаются к воронкам яйцеводов. Попадая через воронки внутрь яйцеводов, ооциты медленно продвигаются к их дистальному концу, покрываясь студенистой оболочкой, выделяемой железами яйцеводов. Одетые студенистыми оболочками ооциты (на стадии метафазы II деления созревания) скапливаются в мешковидно расширенных дистальных отделах яйцеводов, называемых «маточными» (рис. 70). Эти яйцеклетки (ооциты II порядка) берут для искусственного осеменения (примерно через один день после последней инъекции). Точно определить оптимальное время для вскрытия самок по внешним признакам трудно, но нужно иметь в виду, что как раннее взятие яиц, так и их задержка в «матке» приводят к ухудшению качества яиц и снижению их способности к оплодотворению. При плохих условиях содержания лягушки быстро теряют способность реагировать на инъекцию суспензии гипофизов созреванием ооцитов или, если и сохраняют еще такую способность, то дают плохую икру.

Для получения зрелой спермы в лабораторных условиях в осенне-зимний период нет необходимости стимулировать самок введением материала гипофизов, поскольку к моменту наведения в зимнюю спячку в семенниках уже имеется достаточ-

ное количество зрелой спермы. Для получения спермы следует обезглавить самца и разрушить спинной мозг; извлечь семенники — желтые, иногда серые овальные тела, расположенные около переднего края почек, сполоснуть их от крови и тканей, тщательно измельчить ножницами или растереть в ступке и,

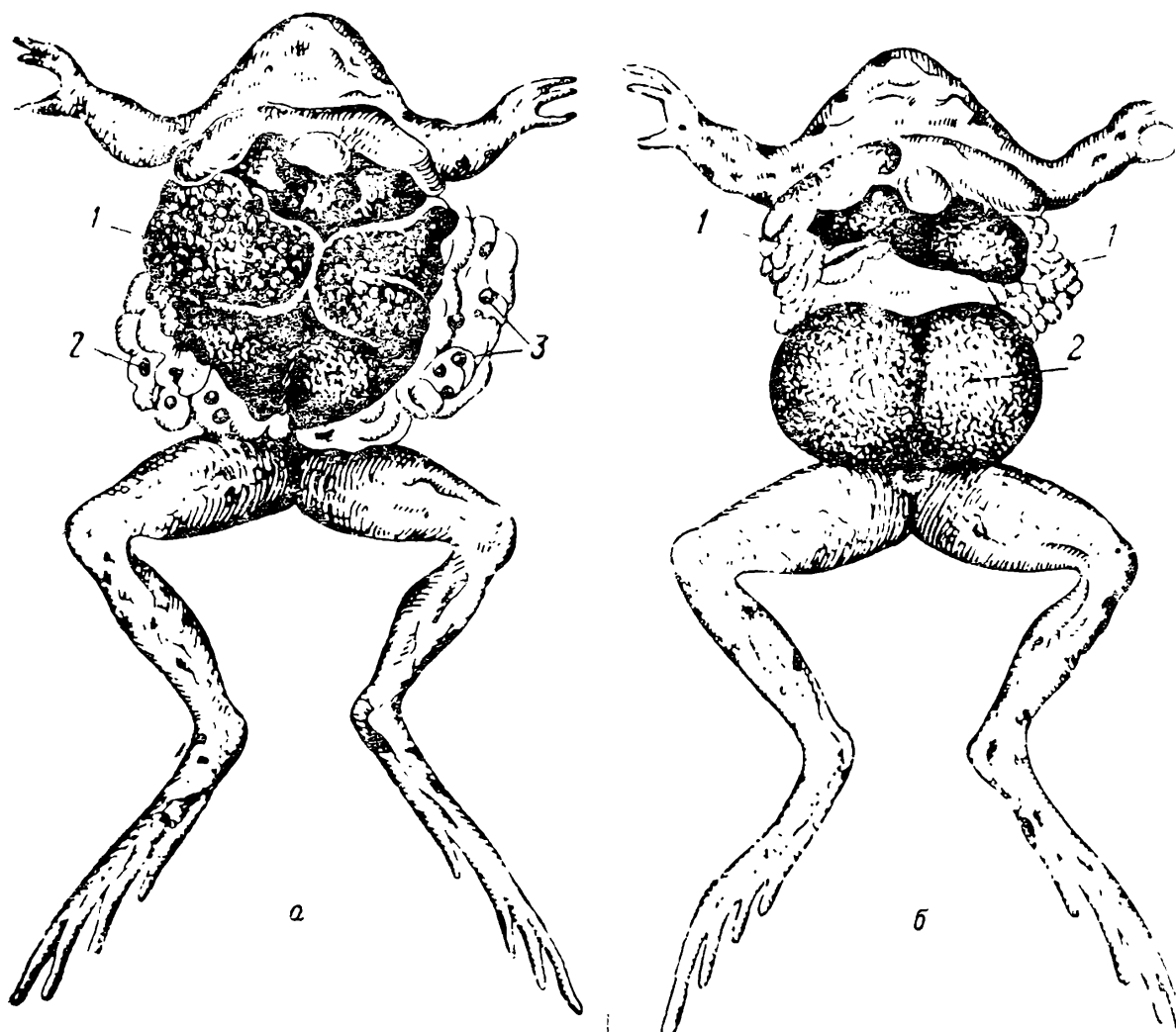


Рис. 70. Результаты введения вещества гипофиза самке травяной лягушки [Киршенблат, 1969].

а — начало овуляции, *б* — половая система самки перед выметом «икры»; 1 — верхние отделы яйцеводов, 2 — нижние отделы яйцеводов, 3 — полостные яйцевые клетки.

залив 10 см³ отстояной воды, оставить на 3-5 мин, в течение которых происходит физиологическая активация сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов контролируется под микроскопом. Для увеличения оплодотворяющей способности спермиев можно использовать вместо отстояной воды 0,25%-ный раствор NaCl. Икру из маточных отделов яйцеводов переносят шпатель или ручкой скальпеля в сухой кристаллизатор, осторожно распределяя ее тонким слоем по дну. Суспензию сперматозоидов наносят на икру кисточкой или пипеткой, через 5-10 мин икру в кристаллизаторе споласкивают от тканей семенника и

ливают отстойной водой, которая должна покрывать икринки большим слоем (2-3 см). Первым признаком начавшегося развития служит поворот икринок анимальным полюсом вверх и появление борозды дробления.

Важным условием нормального развития зародышей и личинок бесхвостых амфибий в лаборатории является достаточный объем свежей воды. В 500 мл воды рекомендуется содержать 25 зародышей или не более 10 головастиков. При более плотном размещении замечены общее отставание, а также асинхронность в развитии разных особей. В невысоких стеклянных аквариумах, высота столба воды в которых не должна превышать 10 см, можно содержать икру и головастиков вплоть до метаморфоза. Водопроходную воду необходимо отстаивать (дехлорировать) в открытых емкостях не менее двух-трех суток. Недостаточно дехлорированная вода может вызвать быструю и массовую гибель животных. Воду в аквариумах следует менять один раз в сутки, а после перехода личинок к активному питанию — один раз в 2—3 дня. При смене воды нельзя допускать перепадов температуры. Оптимальная для развития зародышей температура — от 5 до 18°C. Помещение, в котором содержатся зародыши и личинки амфибий, следует проветривать от паров формалина, ксилола и других реактивов. В некоторых лабораториях полагают, что при длительном содержании головастиков воду в аквариумах лучше не менять, а один раз в неделю доливать дистиллированной водой до исходного уровня. Икра и головастики не нуждаются в постоянной аэрации. От прямого солнечного света зародышей необходимо защищать.

ПРИЖИЗНЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Яйца лягушки одеты тонкой желточной оболочкой, к которой снаружи плотно прилегает студенистая оболочка, выделяемая слизистыми железами яйцеводов. Диаметр яйца составляет 2 мм, а вместе с набухшей студенистой оболочкой — 8—15 мм (рис. 71, а, б). Яйцо лягушки относится к телолецитальному типу. Полярность яйца проявляется в распределении желтка и пигмента. У травяной лягушки анимальная часть яйца черно-бурого цвета из-за наличия в поверхностном слое цитоплазмы пигмента — меланина. Граница пигментированной и непигментированной частей яйца выражена нерезко и проходит ближе к вегетативному полюсу. Желточные гранулы в яйце лягушки распределяются неравномерно. В анимальной части яйца, содержащей ядро, гранул желтка меньше и они мельче, чем в вегетативной.

Оплодотворение у лягушки наружное и происходит обычно в воде. Сперматозоид входит в яйцо или на экваторе, или несколько ниже, ближе к вегетативному полюсу. В процессе опло-

дотворения в яйцах амфибий происходит ряд структурных изменений, с которыми удобно ознакомиться путем прижизненных наблюдений.

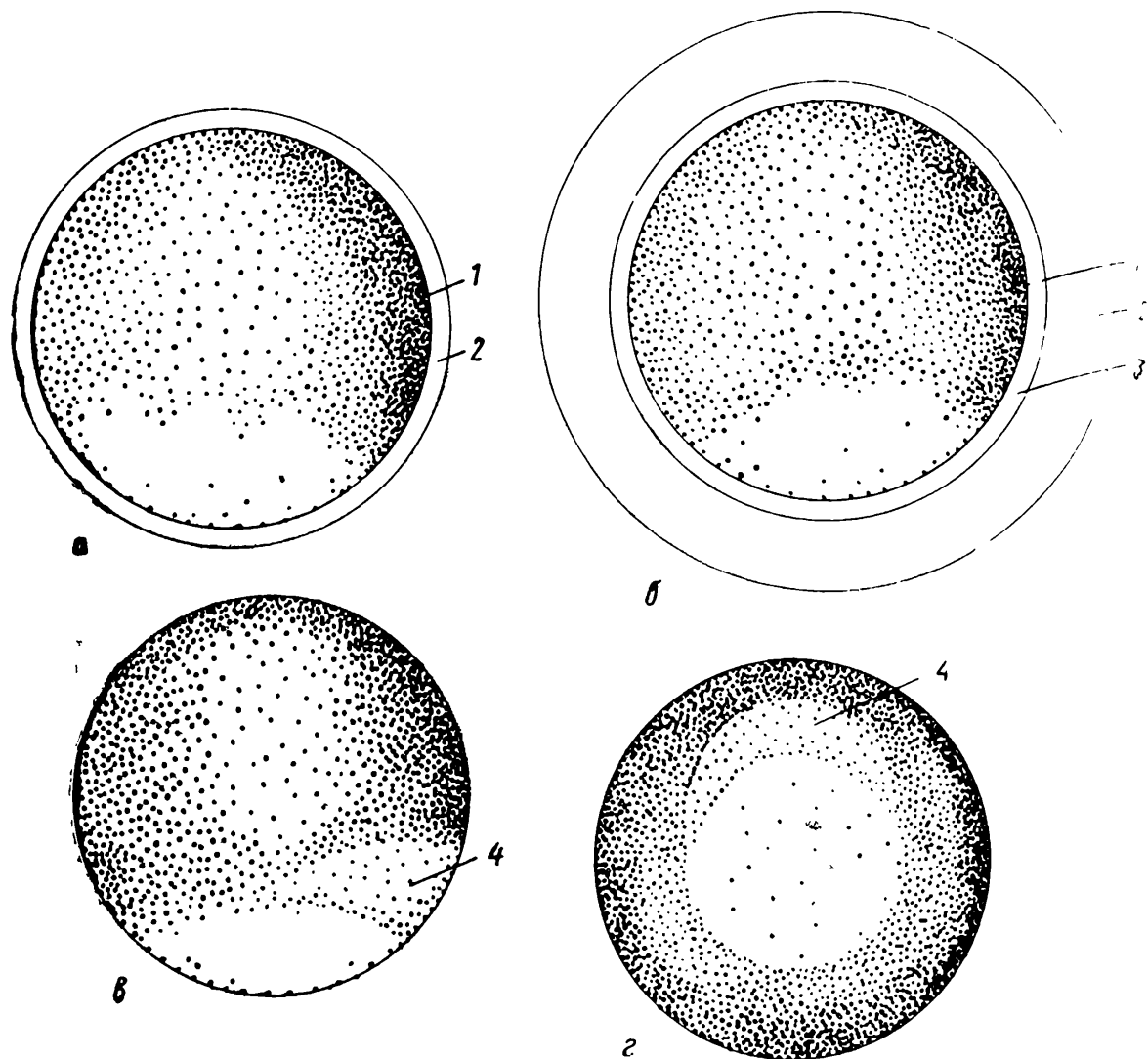


Рис. 71. Изменения в яйце травяной лягушки после оплодотворения [а, б — из «Объектов биологии развития», 1975; в, г — по: Дженкинсон, из: Иванова, 1945].

а — неоплодотворенное яйцо из нижних отделов яйцеводов, б — оплодотворенное активированное яйцо, в — яйцо через 2 ч после оплодотворения (вид сбоку), г — с вегетативного полюса; 1 — желточная и 2 — студенистая оболочки, 3 — перивителлиновое пространство, 4 — серый серп.

Одним из первых признаков активации яйца сперматозоидом является кортикальная реакция, которая у лягушки хорошо исследована. В кортикальном слое яиц, непосредственно примыкающем к оболочке, располагаются кортикальные гранулы, которые можно наблюдать на срезах неоплодотворенной яйцеклетки (см. с. 30). В результате активации содержимое кортикальных гранул выходит на поверхность яйцеклетки и обводняется, что приводит к отслаиванию желточной оболочки и образованию перивителлинового пространства. Перивителлино-

ая жидкость служит средой, в которой развивается зародыш о вылупления.

Кортикальную реакцию лучше наблюдать при искусственной активации полостных яиц, так как в момент нормального оплодотворения этому мешает набухшая, малопрозрачная студенистая оболочка. Для искусственной активации полостные яйцеклетки, еще не имеющие студенистой оболочки, помещают в 0,32%-ный раствор NaCl и укалывают стеклянной микроиглой в анимальном полушарии. При температуре 15 °C через 6 с после укола начинается распад кортикальных гранул вокруг места прокола, что видно по появлению мелких округлых углублений, напоминающих рябь. Распространение волны распада кортикальных гранул можно наблюдать под бинокулярной лупой в отраженном свете.

В результате образования перивителлинового пространства (рис. 71, б) зародыш приобретает способность к свободному вращению внутри оболочек и ориентируется в соответствии с распределением желтка вегетативным полюсом вниз. Такой поворот оплодотворенных яйцеклеток можно наблюдать невооруженным глазом примерно в течение первого получаса после осеменения.

Через час после оплодотворения в яйце начинаются локальные движения цитоплазмы, происходит перераспределение материала, приводящее к появлению серого серпа. В анимальном полушарии яиц амфибий, непосредственно под плазматической мембраной, в кортикальном слое лежат гранулы пигмента. Сперматозоид при вхождении в яйцо увлекает за собой часть гранул, расположенных поблизости от точки его проникновения. Это вызывает отток гранул с противоположной стороны яйца. Поэтому участок кортекса, расположенный напротив места вхождения спермия, обычно несколько ниже экватора, приобретает серый оттенок. Из-за серповидной формы его называют серым серпом (рис. 71, в, г). Образование серого серпа — это проявление ранней региональной дифференциации кортикального слоя в месте будущей дорсальной губы бластопора. С момента появления серпа зигота приобретает признаки билатеральной симметрии; противоположная ему сторона яйца соответствует будущей брюшной стороне зародыша, а так как анимальный полюс соответствует переднему концу зародыша, то с этого момента определяются правая и левая стороны.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Кроме прижизненных наблюдений для изучения нормально развития амфибий можно использовать постоянные препараты. Зародышей нужной стадии отбирают под бинокулярной лупой, затем кладут на ладонь и скальпелем удаляют студенистую оболочку вплоть до самого внутреннего ее слоя, окружаю-

щего желточную оболочку. Для изготовления тотальных препаратов до стадии нейрулы зародышей помещают в 4%-ный раствор нейтрального формалина, нагретый до 75—80 °С (не выше!) на 5 мин. При этом происходит фиксация зародыша и довольно значительное отставание желточной оболочки, позволяет извлечь из нее зародыш при помощи хорошо заточенных препаровальных игл.

Для фиксации зародышей со стадии нейрулы студенистую и желточную оболочки можно удалить одновременно, срезав скальпелем на ладони. При этом в ладонь наливают воду, в которую должен попасть зародыш после освобождения от желточной оболочки, иначе он разрушится под действием сил поверхностного натяжения. Фиксировать зародышей можно в 4%-ном растворе формалина, так и жидкости Буэна. После фиксации и освобождения от желточной оболочки их помещают в первую порцию диоксана на 12 ч, а затем переносят во вторую порцию диоксана, где оставляют на 3—4 сут. Из диоксана материал перекладывают на 1—2 сут в ксилол, а потом в жидкий бальзам, где зародышей можно оставить на 2—3 сут. Затем объект следует сполоснуть ксилолом, чтобы смыть избыток бальзама с поверхности. Полученный в результате описанной проводки «сухой» препарат помещают на маленькую каплю густого бальзама на предметное стекло в рамку из дерева или из органического стекла, предварительно прикрепленную к предметному стеклу. Покровное стекло приклеивают бальзамом к краям рамки.

Ориентация зародышей зависит от стадии развития. Зародыши на стадиях дробления следует помещать боком и анимальным полюсом вверх, что касается зародышей, находящихся на различных этапах гастрюляции, то для наглядности они должны быть сориентированы blastopore (желточной пробкой) вверх. На стадии нейруляции зародыш обычно помещают на предметное стекло брюшной стороной вниз, а на стадии хвостовой почки — кладут на бок.

Для приготовления гистологических срезов хорошего качества необходимо освободить зародыш на нужной стадии развития не только от студенистой, но и от желточной оболочки. Удаление желточной оболочки после фиксации горячим раствором нейтрального формалина описано в методике приготовления тотальных препаратов. Однако фиксировать зародыши для гистологической обработки можно и в жидкости Буэна. Наиболее лучшим методом механического удаления желточной оболочки в этом случае считается метод Баутцмана (см. Ромейс, 1953, с. 567). Из жидкости Буэна, продолжительность фиксации в которой от 12 до 24 ч, зародыши переносят в плоскую чашку с 80%-ным спиртом. Под бинокулярной лупой можно наблюдать, как под действием спирта студенистая оболочка мутнеет и сжимается, при этом становится хорошо различимой ее тон-

ая волокнистая структура. В этот момент следует захватить оболочку глазным пинцетом, а препаровальной иглой про-нуть или разорвать их в одном месте, что позволяет потом с помощью двух пинцетов или препаровальных игл снять одновременно студенистую и желточную оболочки. Важно начать механическое удаление оболочек в определенный момент действия спирта, так как до и после этого момента оболочки удаются лишь частично или не удаляются совсем. В связи с этим к же не рекомендуется переносить в 80%-ный спирт одновременно более двух зародышей. После фиксации в жидкости Буэна и освобождения от оболочек материал проводят через ряд спиртов возрастающей концентрации, начиная с 45%-ного (в каждой порции спирта зародышей оставляют на 12 ч). Из 60%-ного спирта материал помещают в целлоидиновое масло на 7—14 дней, затем переносят последовательно в две порции хлороформа на 1,5—2 ч в каждую, потом в смесь парафина с хлороформом (1:1), в которой содержат материал при 40 °C течение 6—12 ч. Далее проводят заливку в парафин. Хорошие результаты дает как после фиксации в нейтральном формалине, так и в жидкости Буэна проводка через глицерин и модификации М. Н. Скоблиной. Освобожденные от оболочек после фиксации зародыши помещают в плоские чашки, в которые наливают 10%-ный раствор глицерина так, чтобы он только покрывал объект. Затем прикрывают чашки фильтровальной бумагой и оставляют при комнатной температуре до полного испарения воды (обычно на 1—2 сут). Затем зародышей ополаскивают 96%-ным этиловым спиртом и проводят через три смеси 96%-го этанола с бутиловым спиртом в соотношении — 3:1, 1:1, 1:3, а потом через две порции бутилового спирта, оставляя на 10 мин в каждой. Из бутанола материал переносят на 10 мин в парафин I, на 20 мин в парафин II, а затем заливают в парафин.

Для приготовления срезов зародыш в парафиновом блоке должен быть правильно ориентирован. Для этого нагретой препаровальной иглой растапливают парафин в центре блока и в образовавшуюся лунку под контролем бинокулярной лупы переносят зародыш нагретым шпателем. Получение серий срезов желтчатых желтком зародышей лягушки представляет большие трудности. Для того чтобы избежать выкрашивания желтка и получить ленточку срезов толщиной 5—7 мк, следует пропитать поверхность парафинового блока с объектом смесью глицерина и 60%-го этанола (9:1), поместив его в эту смесь приблизительно на 1 ч. Кроме того, на поверхность блока следует время от времени класть кусочек льда. Дальнейшая обработка срезов производится с использованием общеизвестных методов. Срезы окрашивают гематоксилином Майера или Карazzi; начиная со стадии нейрулы можно рекомендовать окраску по Маллори.

Стадии дробления. С дроблением яйца лягушки можно познакомиться, рассматривая живые яйца или тотальные препараты в падающем свете (так как яйца непрозрачные) под бинокулярной лупой. Начиная со стадии 8 бластомеров, яйца следует рассматривать сбоку, чтобы видеть одновременно и анимальные, и вегетативные бластомеры.

Телолецитальные яйца лягушки дробятся полностью, но неравномерно. Первые две борозды меридиональные, проходят перпендикулярно друг другу, разделяя яйцо сначала на две, а затем на четыре одинаковые по размеру клетки (рис. 72, а,

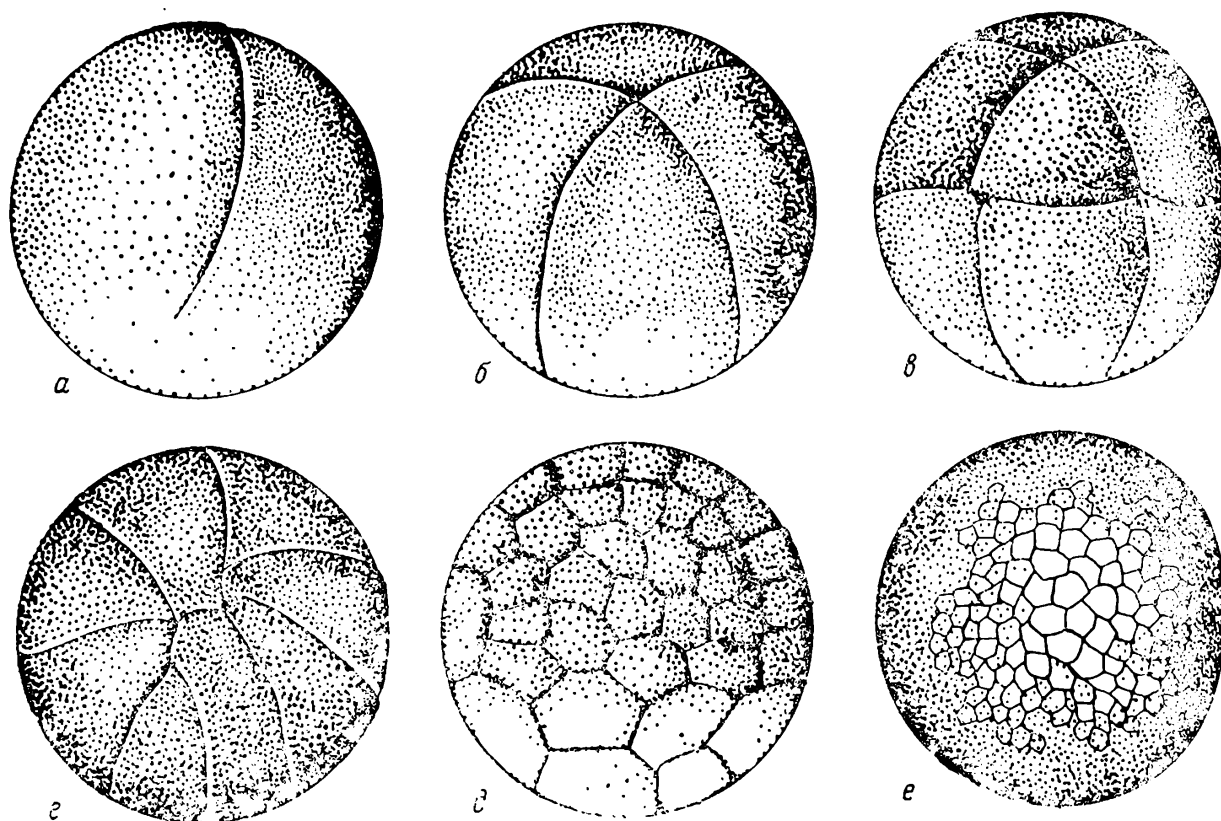


Рис. 72. Последовательные стадии развития травяной лягушки [Дабагян, Слепцова, 1975].

а — первая борозда дробления прошла 3/4 окружности яйца, б — 4 бластомера, в — 8, г — 16 (с анимального полюса), д — 64 бластомера (ранняя бластула), е — эпителизная бластула (с вегетативного полюса).

б). Однако уже при первых делениях дает себя знать неравномерное распределение желточных включений в яйце: меридиональные борозды врезаются в поверхность яйца не одновременно на всем протяжении, а распространяются постепенно от анимального полюса к вегетативному. Начиная с третьего деления дробление становится неравномерным. Третья борозда широтная, проходит параллельно экватору, но ближе к анимальному полюсу и делит яйцо на анимальные микромеры и вегетативные макромеры. Различия в размерах бластомеров

Хорошо видны при рассматривании зародыша сбоку (рис. 72, в). Далее происходит чередование меридиональных и широтных борозд, причем и все последующие широтные деления равномерны, ближе к анимальному полюсу образуются более мелкие клетки. Прохождение меридиональных борозд всегда несколько замедляется в вегетативном полушарии. Хотя дробление лягушки относится к радиальному типу, оно довольно рано утрачивает геометрическую правильность, а начиная с 5-го деления, становится асинхронным — анимальные клетки делятся быстрее, что еще больше усиливает неравномерность дробления (рис. 72, г—е).

Меридиональный разрез через бластомерную бластулу. На стадии 32 бластомеров появляется полость — бластоцель, и зародыш представляет собой раннюю бластулу. Из-за неравномерности дробления бластоцель сильно сдвинут к анимальному полюсу. На этой стадии, так же как и на последующей 64 клеточной, бластомеры лежат в один слой (рис. 73, а). На срезе хорошо видно, что вегетативные бластомеры значительно крупнее анимальных. В некоторых клетках хорошо различимы ядра. Вегетативные бластомеры богаче желточными включениями, чем анимальные. В макромерах желток выглядит крупными округлыми гранулами. Хорошо различимы в клетках и пигментные включения, отчетливо выраженные по периферии анимальных бластомеров. Клетки ранней бластулы закруглены и местами неплотно соприкасаются между собой. Эту стадию называют бластомерной бластулой.

Меридиональный срез через эпителиальную бластулу. Со стадии 128 бластомеров деление клеток становится беспорядочным; наблюдаются борозды, проходящие параллельно поверхности бластулы или наискось, вследствие этого стенка бластулы становится многослойной (рис. 73, б). Обычно анимальная стенка поздней бластулы состоит из 1—3 рядов клеток, которые здесь утрачивают округлые очертания и плотно прилегают друг к другу, при этом в их расположении намечается эпителиальный характер, почему эту стадию и называют эпителиальной бластулой. Вегетативная часть стенки поздней бластулы довольно массивна, ее крупные клетки в этот период еще сохраняют округлую форму, местами лежат, неплотно соприкасаясь между собой. В «краевой» или экваториальной части стенки различимы 3—4 ряда клеток, тогда как в вегетативной стенке клетки не образуют правильных рядов.

Ранняя гастрולה на тотальном препарате. Гастрюляция амфибий протекает своеобразно и имеет эксцентрический характер. В ходе гастрюляции происходит перемещение клеточного материала от анимального полюса к вегетативному; особенно интенсивен этот процесс на спинной стороне зародыша. Здесь образуется щелевидный бластопор, благодаря движению области серого серпа клеточного материала со стороны

анимального полюса, а также со стороны вегетативного полюса, где перемещение клеток происходит медленнее. Через образовавшуюся щель клетки погружаются (инвагинируют) внутрь, при этом образуется довольно глубокая, но узкая гастральная полость. Через боковые губы бластопора тоже идет инвагинация клеточного материала, но несравненно слабее, чем

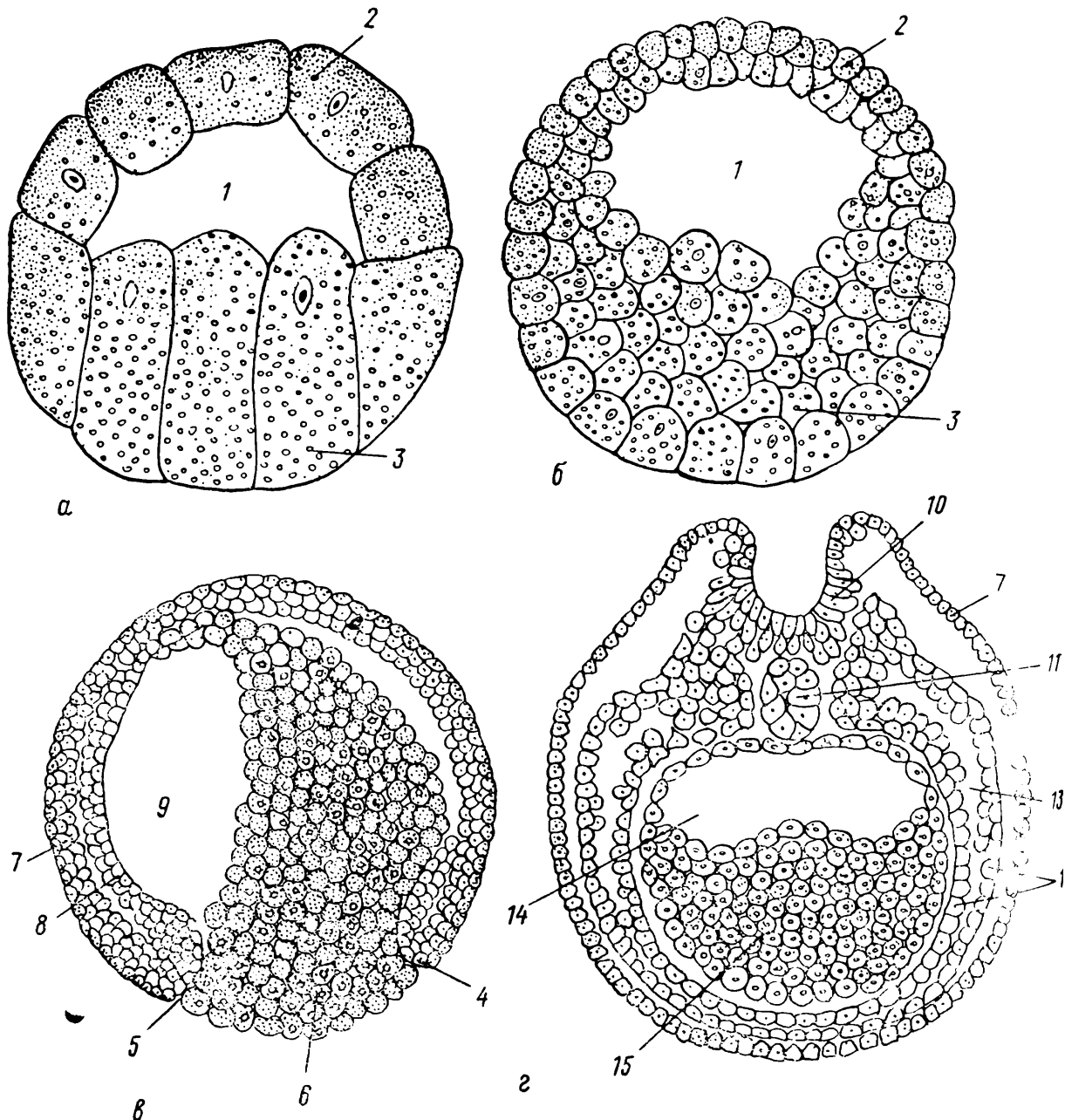


Рис. 73. Последовательные стадии развития травяной лягушки на срезах. Ув. $\times 30$.

а, б — меридиональные разрезы через бластомерную (а) и эпителиальную (б) стадию, в — сагиттальный разрез через позднюю гастралу, г — поперечный разрез нейрулы; 1 — бластоцель, 2 — микромеры, 3 — макромеры, 4 — дорсальная губа, 5 — вентральная губа бластопора, 6 — желточная пробка, 7 — эктодерма, 8 — энтодерма, 9 — гастрощель, 10 — нервная пластинка, 11 — хорда, 12 — листки спланхнотомы, 13 — листки спланхнотомы, 14 — средняя кишка, 15 — желточная энтодерма.

через спинную губу. На брюшной стороне зародыша гастральной впячивания не наблюдается, происходит лишь незначительное подворачивание края бластопора, обрастание анималь-

ными клетками вегетативных, т. е. гастрюляция имеет характер пибболии.

Внешне гастрюляция начинается с появления в средней части серого серпа, т. е. несколько ниже экватора, щелевидного бластопора. Эта горизонтальная щель скоро становится отчетливо заметной, образуя резкую границу между темными пигментированными клетками анимального полушария и светлыми вегетативными клетками (рис. 74, а). Затем щелевидный бла-

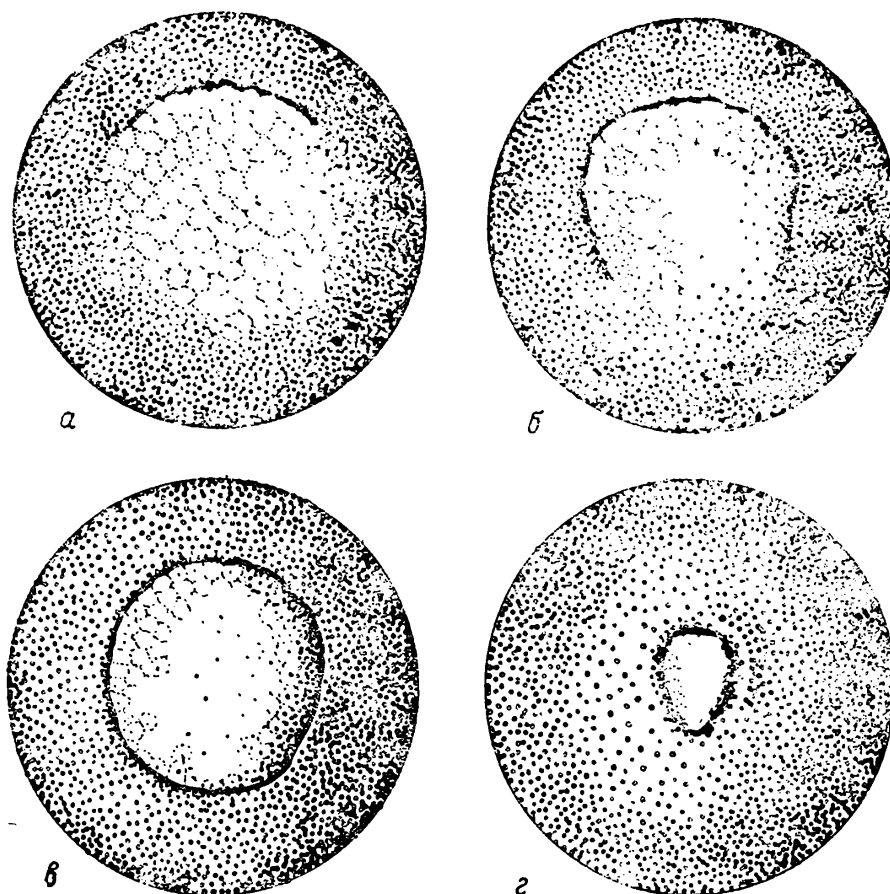


Рис. 74. Последовательные этапы гастрюляции у лягушки [Дабагян и Слепцова, 1975].

а — дорсальная и б — латеральные губы бластопора, в — большая и г — малая желточная пробка.

стопор удлиняется и огибает своими боковыми концами вегетативный полюс, принимая серповидную форму. Ограничивающая спереди бластопор складка бластодермы называется его спинной или дорсальной губой.

Поздняя гастрюла на тотальном препарате. В процессе гастрюляции щель бластопора продолжает расти, охватывая светлую вегетативную зону сначала полукольцом (образуются боковые губы бластопора) (рис. 74, б), а потом и полным кольцом — появляется вентральная губа (рис. 74, в). Заключенный внутри кольцевидного бластопора вегетативный материал называется желточной пробкой. Так как клетки желточной пробки не содержат пигмента, то она хорошо различается как округ-

лое, светлое пятно на темной поверхности зародыша. К концу гастрюляции кольцевидный бластопор уменьшается до узкого отверстия (рис. 74, з).

Сагиттальный разрез через позднюю гастралу. В процессе гастрюляции почти сферическая форма зародыша существенно не изменяется. Внутреннее его строение на стадии желточной пробки показано на рис. 73, в, где несколько схематично изображен разрез через центральную часть зародыша. В качестве ориентира для определения переднего и заднего концов зародыша может служить область бластопора, где на поверхность зародыша все еще выходят богатые желтком клетки желточной пробки. По своему положению бластопор соответствует заднему концу зародыша. Дорсальная губа бластопора на срезе хорошо различима, так как здесь бластопор ведет в довольно обширную гастральную полость или полость первичного кишечника (архентерон). В конце гастрюляции дно архентерона, или его брюшная стенка, образованы массивным слоем энтодермальных клеток вегетативной области. Дорсальная стенка архентерона довольно тонка и состоит всего лишь из 2—3 рядов клеток. В ходе гастрюляции эктодерма покрывает всю поверхность зародыша. При этом к концу гастрюляции презумптивный эпидермис истончается и превращается в слой толщиной в две клетки, причем самые поверхностные клетки содержат пигмент. На срезе различимы также остатки бластоцеля между эктодермой и стенкой первичного кишечника.

Нейрула на тотальном препарате. После завершения гастрюляции зародыш приобретает продолговатую форму и переходит к стадии нейрулы: на его спинной стороне появляется утолщенная широкая полоса эктодермы — нервная пластинка. Затем края ее приподнимаются и образуют нервные (медуллярные) валики. Остальная часть эктодермы представляет собой зачаток кожных покровов. Нервные валики возникают сначала на переднем конце зародыша, а затем постепенно появляются в средней и задней частях. Впоследствии валики становятся все более высокими, сближаются сначала в срединной части, а затем и в задней; наконец, они смыкаются своими гребнями, образуя нервную трубку. Передний отдел нервной трубки формируется позднее, также путем смыкания валиков, которые, однако, здесь более высокие, поэтому головной отдел медуллярной трубки оказывается расширенным (рис. 75, а, в), и здесь дольше всего сохраняется сообщение нервной трубки с внешней средой — нейропор. Передняя расширенная часть нервной трубки превращается в зачаток головного мозга, более узкая туловищная ее часть — в зачаток спинного мозга.

На стадии поздней нейрулы щелевидный бластопор разделяется на две ямки образующимся клеточным материалом будущей хвостовой почки. Передняя, верхняя ямка представляет собой истинный бластопор, ведущий в полость кишечника. При

закрывании нервных валиков в трубку эта ямка бластопора становится отверстием (не всегда хорошо выраженным), соединяющим невроцель с полостью кишечника, т. е. формирует нервно-кишечный канал. Задняя или нижняя ямка, непосредственно соединяющаяся с полостью кишки, превращается позднее в анальное отверстие.

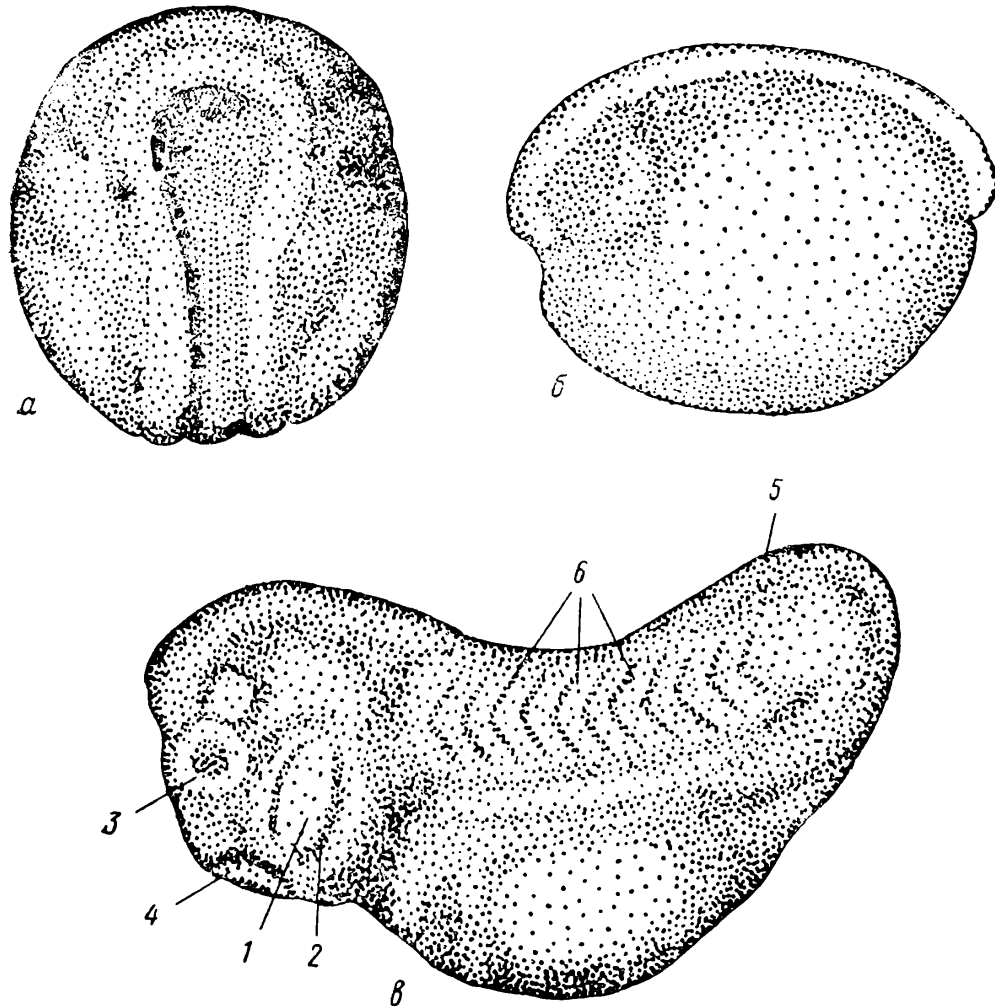


Рис. 75. Стадии нейрулы и хвостовой почки лягушки [Дабагян и Слепцова, 1975].

а, б — ранняя нейрула (а — вид с дорсальной стороны и несколько спереди, б — вид сбоку); в — хвостовая почка (вид сбоку); 1 — жаберный бугор, 2 — жаберные дуги, 3 — спинной бугор, 4 — валик присоски, 5 — хвостовая почка, 6 — ребристость эктодермы, вызванная образованием сомитов.

Поперечный срез через нейрулу. На стадии нейрулы происходит обособление основных зачатков, а затем и внутренних органов. Так, подворачивающийся через дорсальную губу бластопора материал медианной части серого серпа и входящий к концу гастрюляции в состав срединной части крыши первичной кишки обособляется на стадии нейрулы в форме плотного цилиндрического тяжа клеток — зачатка спинной струны, или хорды. Клеточный материал, погружающийся через боковые губы бластопора, не входит в состав стенки архентерона, а с самого начала гастрюляции врастает между эктодермой и энто-

дермой. Эти боковые клеточные пласты образуют средний зародышевый листок, или мезодерму. Клеточный материал массивной вегетативной половины бластулы представляет собой энтодерму. Некоторая часть клеток в глубоких участках энтодермальной «подушки» разрушается, и их желточные включения идут на питание зародыша. Эта часть энтодермы, не принимающая участия в построении стенки кишечника и являющаяся провизорной, может быть обозначена как желточная энтодерма. Остальная часть, идущая на образование кишечного эпителия, представляет собой кишечную энтодерму.

На поперечном срезе через нейрулу (рис. 73, г) видна сформированная нервная пластинка, клетки которой отличаются от клеток кожной эктодермы более удлиненной формой. Под нервной пластинкой располагается хорда, в своей вентральной части примыкающая к дорсальной тонкостенной части кишечной трубки. На этой стадии кишечная трубка еще замкнута и не имеет ни ротового, ни заднепроходного отверстия. По бокам зародыша располагается мезодерма, которая в области хорды лежит в виде утолщенных клеточных пластов. Кроме того, на срезе хорошо видно, что латеральные полосы мезодермы врастают вентрально между эктодермой и энтодермой в blastocoel, пока не сомкнутся под первичной кишкой. Одновременно с врастанием происходит деление боковых мезодермальных пластинок на наружный и внутренний листки спланхнотомы. Полость, образуемая между ними, представляет собой целом.

Стадия хвостовой почки (тотальный препарат). Дальнейшие изменения формы зародыша состоят в удлинении тела по продольной оси и в образовании хвостовой почки. Она появляется в каудальной части зародыша, в области перво-кишечного канала в виде конического выроста, растущего назад и несколько вверх. Рост хвостовой почки сопровождается дифференцировкой клеточного материала сначала в передней ее части, а по мере роста почки распространяется кзади. Под основанием хвостовой почки находится анальное отверстие.

Если смотреть на зародыш сбоку, хорошо заметен прогиб спины (рис. 75, в). В передней части зародыша, по обеим сторонам, видны утолщения или вздутия — жаберные бугры. С их появлением становится ясно выраженной граница головы и туловища. На поверхности каждого жаберного бугра видны три удлиненные утолщения — зачатки жаберных дуг. Впереди от них хорошо различимы два боковых выступа — глазные пузырьки. Ниже их, ближе к средней линии наметились обонятельные ямки, а еще ниже, на срединной линии закладывается stomodaeum. В нижней задней части головы, по бокам от вентральной срединной линии видны оформившиеся присоски с выстилками валиками. Позади жаберных бугров, по бокам тела зародыша заметны несколько пар выпуклостей. Это мезодер-

льные сомиты, которые немного выпячивают эктодерму. Позднее зачаток хвоста уплощается с боков, и на спинной и брюшной сторонах его появляется плавниковая оторочка.

Сагиттальный срез на стадии хвостовой почки. На сагиттальном срезе через хвостовую почку (рис. 76, а) видно, что в головном отделе вследствие удлинения его по продольной оси зачаток мозга выдвигается вперед за передний конец хорды и перегибается через него книзу. Заметны местные утолщения стенки мозга. Разделение зачатка мозга на первичные мозговые пузыри происходит несколько позднее. Вентральная стенка передней кишки образует складку, благодаря чему передняя кишка подразделяется на широкую часть, лежащую под формирующимся головным мозгом, и заднюю часть, которая представляет собой печеночный вырост — зачаток печени. Вентральная стенка кишки позади зачатка печени состоит из нескольких слоев клеток, все еще содержащих много желтка. Под средней частью передней кишки виден мезенхимный мешочек — зачаток сердца, и рыхло лежащая кровяная мезенхима. Другие мезодермальные зачатки на сагиттальном срезе не видны, так как они лежат в боковых частях зародыша.

Нервно-кишечный канал зародыша окружен образовательным материалом хвостовой почки. Из него дифференцируются (назад и несколько кверху) продолжение нервной трубки, хорды и миотомы хвоста. Спланхнотомы и нефротомы отсутствуют в хвостовом отделе. Книзу и вперед материал хвостовой почки дает продолжение кишечного канала, называемое хвостовой кишкой. Образовавшееся к этому времени анальное отверстие лежит, таким образом, далеко впереди от заднего конца хвостовой кишки. Позднее она утрачивает просвет и превращается в плотный тяж клеток.

Поперечный срез через туловищную часть зародыша на стадии хвостовой почки. На срезе, прошедшем в области туловищных сомитов (рис. 76, б), под нервной трубкой видна хорда. Дорсолатеральнее нервной трубки располагается нервный гребень, или ганглиозная пластинка. Она образуется в результате выселения сюда части эктодермальных клеток при смыкании краев эпидермиса над нервной трубкой. Видно, что дорсальная и вентральная стенки нервной трубки тоньше, чем боковые. Под хордой находится средняя кишка. Дорсальная стенка средней кишки состоит из тонкого пласта энтодермальных клеток, а довольно массивная вентральная стенка образована большими желтком клетками энтодермы. Мезодерма дифференцируется на: 1) дорсальные сегменты — сомиты, 2) сегментные почки, или нефротомы и 3) расположенные наиболее вентрально «боковые пластинки», или спланхнотомы. Сомиты и нефротомы сегментируются, подразделяясь постепенно на все большее количество следующих друг за другом парных метамерных участков. Спланхнотомы же остаются несегментированными.

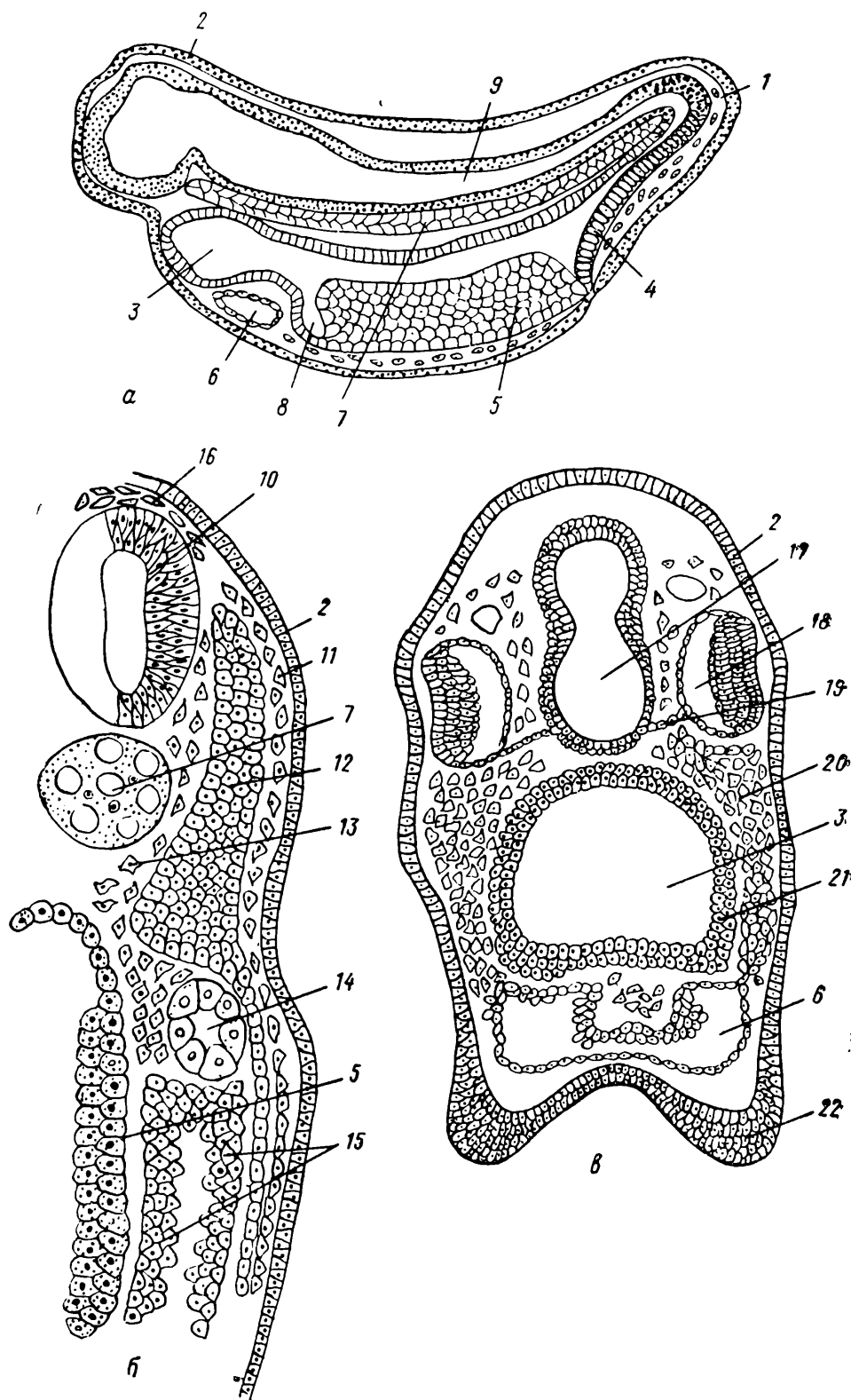


Рис. 76. Стадия хвостовой почки лягушки.

a — сагиттальный разрез [Иванов, 1945], *б*, *в* — поперечные разрез в области хвоста (*б*) и головы (*в*); 1 — хвостовая почка, 2 — эктодерма, 3 — головная кишка, 4 — хвостовая кишка, 5 — желточная энтодерма, 6 — зачаток сердца, 7 — хорда, 8 — зачаток печени, 9 — нейроцель, 10 — нервная трубка, 11 — дерматом, 12 — миотом, 13 — склеротом, 14 — нефротом, 15 — листки спланхнотома, 16 — ганглиозная пластинка, 17 — передний и средний мозговые пузыри, 18 — глазной пузырек, 19 — глазной склеротом, 20 — мезенхима, 21 — кишечная энтодерма, 22 — валик присоски.

Подразделяясь на висцеральный (внутренний) и париетальный (наружный) листки с щелевидной вторичной полостью (целомом) между ними, спланхнотомы правой и левой сторон тела прорастают друг с другом под кишечной трубкой, так что целолическая полость становится общей для всех сегментов и обеих сторон тела. Висцеральный листок прирастает к кишке и другим внутренним органам и образует их серозную оболочку; париетальный листок прирастает изнутри к стенке тела, образуя пристеночную брюшину. Сомит, в свою очередь, разделяется на миотом, дающий начало мускулатуре, дерматом, примыкающий к эпидермису и образующий соединительнотканную основу кожи, и склеротом, рыхло лежащие клетки которого окружают хорду и нервную трубку и дают начало скелетным тканям: сначала хрящевой, а позднее костной. Нефротомы нескольких (2—4) наиболее краниальных сегментов тела из клеточных полосок, связывающих сомиты с боковыми пластинками мезодермы, становятся полыми и вытягиваются в виде каналов пронефроса, или предпочки; один из них виден на рисунке.

Поперечный срез через головной отдел зародыша на стадии хвостовой почки. В дорсальной части среза (рис. 76, в), прошедшего в области головной кишки, хорошо видны передний и средний мозговые пузыри. По бокам от первичного переднего мозга различимы глазные зачатки, которые сначала закладываются как булавовидные выступы боковых стенок переднего мозгового пузыря, а потом отшнуровываются от него в виде глазных пузырей. С первичным передним мозгом они соединены глазными стебельками. Обращенная к эпидермису стенка глазного пузырька уплощена и много толще внутренней. На срезе зафиксировано начало инвагинации передней стенки в полость глазного пузырька, в результате чего образуется глазной бокал. Затем прилежащий к нему участок эпидермиса утолщается и превращается из плоского в столбчатый. По мере впячивания стенки глазного бокала утолщенная часть эпидермиса впячивается вслед за ней, а потом отшнуровывается. Возникает зачаток глазного хрусталика — хрусталиковый пузырек. Расположенный над хрусталиком покровный эпителий истончается, теряет пигмент и становится прозрачным. Из него образуется роговица глаза. Клетки мезенхимы образуют сосудистую оболочку глаза, а также склеру — опорную оболочку глазного яблока. Внутренний листок бокала развивается в сетчатку, а наружный истончается и формирует пигментный эпителий глаза.

Под зачатком головного мозга располагается тонкостенная, расширенная передняя (головная) кишка, из нее позднее развивается жаберный отдел. Латеральнее головной кишки, справа и слева от нее, располагается рыхлым слоем кровяная мезенхима. Клетки склеротома, выделившиеся из массы мезенхимы.

ных клеток, окружают зачаток головного мозга. В брюшной области зародыша висцеральный листок спланхнотомы выгибается желобообразно книзу, образуя открытый к стенке передней кишки мешок, в который смещается кровяная мезенхима, возникающая независимо от миотомов. Из этой мезенхимы формируется сначала парный, а потом единственный мезенхимный мешочек, или эндокард сердца — внутренняя эндотелиальная выстилка сердца. Позднее края висцерального мешка смыкаются над эндокардом, образуя миокард — зачаток мышечного слоя стенки сердца. Из клеток висцерального листка мезодермы также возникает эпикард, который дифференцируется в эпителий, одевающий сердце снаружи. Примыкающая к зачатку сердца часть соматического листка мезодермы образует перикард — околосердечную сумку. Заключенный в перикарде участок целома становится околосердечной полостью.

В вентральной области зародыша видны латеральные утолщенные участки эпидермиса. Это валики присосок. Впячивание эпидермиса на брюшной стороне представляет собой стомодеум.

К моменту вылупления из хвостовой почки у головастика лягушки образуется хвост как провизорный орган, окаймленный высокой кожной складкой — хвостовым плавником. К провизорным органам личинки относятся также наружные жабры и роговые губные зубы.

ПТИЦЫ

С развитием птиц лучше всего познакомиться на примере эмбриогенеза домашней курицы (*Gallus domesticus*), так как куриный зародыш является классическим объектом изучения закономерностей эмбрионального развития.*

Развитие зародыша можно наблюдать прижизненно, инкубируя яйца в лабораторных условиях. Естественная продолжительность яйцекладки у кур — с февраля по июнь, но и в другие месяцы можно получать удовлетворительный материал (за исключением самых жарких и самых холодных месяцев).

Для работы желательно использовать свежеснесенные яйца или не позже чем через 3—4 дня после откладки. В случае необходимости яйца можно хранить непродолжительное время (не больше недели), соблюдая требования, необходимые для сохранения находящимися в диапаузе эмбрионами способности к развитию, т. е. в хорошо проветриваемом прохладном помещении ($t = +10—12,8^{\circ}\text{C}$), в котором поддерживается высокая влажность воздуха (70—80%). При продолжительном хранении яиц способность к нормальному развитию значительно снижается. Правильный режим инкубации обеспечивает нормальное развитие зародышей.**

ПРИЖИЗНЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Для прижизненного наблюдения развития зародышей можно проводить периодические вскрытия инкубируемых яиц. Наи-

* Нормальное развитие курицы описано в сводках Гамильтона [Hamilton, 1952], Романова [Romanoff, 1960], М. Н. Рогозиной [1961] и В. В. Рольника [1968]. Таблицы нормального развития, разработанные Гамбургером и Гамильтоном [Hamburger, Hamilton, 1951], приводятся в книге «Объекты биологии развития» [Рогозина, 1975].

** Сведения об инкубации куриных яиц представлены в книгах М. Н. Рогозиной [1961], и В. В. Рольника [1968].

более простой способ — разбить скорлупу, вылить содержимое яйца в чашку Петри и рассматривать развивающихся зародышей либо невооруженным глазом, так как они достаточно крупны, либо с помощью стереоскопического микроскопа в отраженном свете. Отпрепарированных на ранних стадиях развития зародышей (см. ниже) можно рассматривать как в проходящем свете, так и в отраженном. В последнем случае для создания контрастности можно поставить чашку Петри с зародышем на черную пластинку.

Начать следует с вскрытия свежеснесенного яйца, а затем вскрывать последовательно через 1, 2, 3, 4, 7, 14 и 18 сут после начала инкубации.

Перед вскрытием неинкубированное яйцо, а также яйца на стадиях 1—4 дней инкубации следует на несколько минут положить в горизонтальное положение, за это время бластодиск займет самое верхнее положение, затем, не поворачивая яйца, разбить скорлупу и вылить его содержимое в чашку Петри, при этом бластодиск окажется наверху. На более поздних стадиях развития, когда зародышевые оболочки хорошо развиты, богаты кровеносными сосудами и подстилают скорлупу яйца, произвести вскрытие, не повредив их, невозможно. Яйцо следует поместить в чашку Петри, разрезать ножницами его скорлупу в продольном направлении и разнять две половинки скорлупы.

Прижизненные наблюдения можно проводить за одним и тем же зародышем, сделав отверстие в скорлупе яйца. Для этого используются специальные методы, описанные Е. Б. Кричинской и В. И. Ефремовым в книге «Методы биологии развития» [1975]. Здесь рассмотрим лишь два из них.

Метод «окошечка». За час до начала работы необходимо приготовить расплавленный парафин и подогретый до 37 °С физиологический раствор (0,85%-ный NaCl), поместить инструменты в 70%-ный спирт, подготовить рабочее место, руки протереть спиртом.

Яйцо вынуть из инкубатора и положить в горизонтальное положение, через некоторое время бластодиск окажется наверху. Поверхность скорлупы протереть смесью 95%-го спирта с несколькими каплями однопроцентного раствора иода. Выпилить, используя тонкие пилки или миниатюрные напильники, отверстие (лучше квадратное) в скорлупе, которое должно быть на 2—3 мм уже покровного стекла. Следует избегать повреждения подскорлуповой оболочки. С поверхности скорлупы и подскорлуповой оболочки удалить скорлуповые опилки. Смочить поверхность подскорлуповой оболочки стерильным физиологическим раствором и острыми тонкими ножницами обрезать подскорлуповую оболочку по краю скорлупы. С помощью подогретой пипетки нанести валик расплавленного парафина на поверхность скорлупы по периметру окошечка на расстоянии 1—2 мм от края. Необходимо избегать попадания парафина в яйцо.

е сухое покрывное стекло слегка подогреть над пламенем горелки и наложить на парафиновый валик, проследить чтобы оно прочно прилипло, закрыв доступ воздуху. Во избежание прилипания зародыша к стеклу можно проткнуть скорлупу в области воздушной камеры — эмбрион опустится и отойдет от подскорлуповой оболочки. Отверстие заделать парафином. Закончив работу, яйцо помещают в инкубатор, поддерживая его в горизонтальном положении (рис. 77, а).

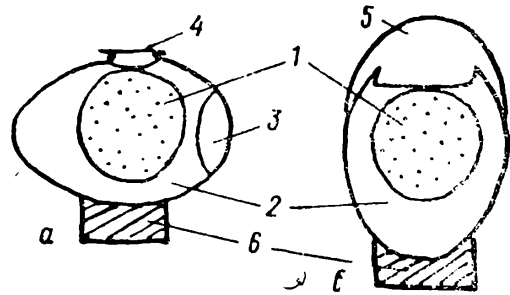


Рис. 77. Методы прижизненных наблюдений над развитием куриных эмбрионов (из New.).

а — метод «окошечка», б — метод скорлуповой «шапочки»; 1 — желток, 2 — белок, 3 — воздушная камера, 4 — покрывное стекло, 5 — скорлуповая «шапочка», 6 — подставка.

Метод скорлуповой «шапочки». На оплодотворенном яйце делают простым карандашом круг в области воздушной камеры. Стерилизуют скорлупу яйца, как указано в изложении предыдущей методики. Спиливают скорлупу с тупого конца яйца и удаляют подскорлуповую оболочку. Отверстие в скорлупе закрывают, подложив на него скорлуповую «шапочку» несколько большего размера, снятую с другого яйца. Такая скорлуповая крышечка приклеивается к яйцу, что облегчает открывание и закрывание яйца при необходимости вести регулярные наблюдения за зародышем (рис. 77, б). «Шапочку» готовят заранее, распиливая яйцо приблизительно на 1 см ниже воздушной камеры, т. е. используют скорлупу с тупого конца яйца. Границу воздушной камеры можно видеть, осветив яйцо сбоку с помощью светителя к микроскопу. Удаляют подскорлуповую оболочку и помещают «шапочку» в 95%-ный спирт с несколькими каплями однопроцентного раствора иода. Яйцо с крышечкой помещают в инкубатор в вертикальном положении.

В этом разделе рассматриваются только внешние картины развития в той мере, в какой их можно без больших усилий наблюдать прижизненно; более подробные сведения о процессах развития различных эмбриональных структур и провизорных органов даются при описании постоянных препаратов. Ознакомиться с ними рекомендуется и перед началом прижизненных наблюдений.

Продолжительность развития куриного эмбриона 21 день. Периодическое вскрытие яиц позволяет проследить постепенное сложение организации зародыша и изменения в зародышевых оболочках. Для ориентирования в препаратах можно пользоваться картинками фиксированных тотальных препаратов, имея в виду, что при прижизненных наблюдениях не видно многих структур и деталей, которые хорошо выявляются на постоянных препаратах. Приводимые ниже указания о времени инкубации

для получения той или иной стадии соответствуют развитию при $t = +37,5^{\circ}\text{C}$.

При вскрытии упомянутым способом свежееотложенного яйца на поверхности желтка можно видеть округлое белое пятно — бластодиск, диаметр которого 2,5—3 мм, т.е. приблизительно в 10 раз меньше диаметра желтка. В бластодиске можно различить внутреннюю, более темную и наружную, более светлую часть, имеющую форму кольца. Если же рассматривать бластодиск, снятый с желтка, в проходящем свете, то картина обратная: центральная часть оказывается прозрачной и поэтому называется *area pellucida*, а периферическая часть — область налегания бластодиска на желток — темной — *area opaca* (см. рис. 80). В процессе последующего развития наружный край бластодиска постепенно обрастает желток.

При вскрытии яйца через 24 ч инкубации видим, что диаметр бластодиска увеличивается до 0,5 см. Форма *area pellucida* за это время становится из округлой грушевидной и на ней вдоль средней линии располагается первичная полоска, простирающаяся от заднего суженного конца *area pellucida* до ее середины в виде тонкой белой линии (см. рис. 81, а).

Через 48 ч инкубации наблюдается дальнейшее увеличение диаметра бластодиска; *area pellucida* имеет форму вытянутого овала, по ее средней линии располагается зародыш (см. рис. 87). Можно различить головной отдел с хорошо видимыми первичными передним мозгом и глазными пузырями, средним мозгом и первичным задним мозгом. В средней части зародыша различаются мезодермальные сегменты — сомиты. На этой стадии *area opaca* подразделяется на две концентрические области, одна из них, прилежащая к *area pellucida*, преобразуется в сосудистое поле — *area vasculosa*, где имеется обилие кровяных островков — скопление мезенхимных клеток, из которых в дальнейшем формируются кровеносные сосуды и кровяные клетки. Кровяные островки расположены более плотно в задней части сосудистого поля. *Area vasculosa* ограничена по своему краю терминальной веной или синусом. Периферическая часть *area opaca* — *area vitellina* (желточная зона) есть край бластодиска, который постепенно обрастает желток. *Area vasculosa* и *area vitellina* образуют закладку желточного мешка — провизорного органа, выполняющего функцию переваривания и всасывания желтка и одновременно служащего на ранних стадиях развития зародыша первым кроветворным органом и органом дыхания, так как кровеносные сосуды желточного мешка приближены к подскорлуповой оболочке. Устойчивое положение желточного мешка в белке анимальным полюсом кверху обеспечивается халазами. Одним из самых существенных моментов в развитии зародыша на вторые сутки инкубации является начало ритмического сокращения сердца и кровообращения. Красная окраска крови дает возможность наблюдать пульсацию сердца.

Зародыш на стадии 72 ч инкубации достигает 7 мм в длину. Тело зародыша изогнуто в области головы и шеи. Передняя часть тела зародыша левым боком лежит на желтке (см. рис. 8, б). Различается трубчатое сердце, которое S-образно изогнуто и лежит сбоку от зародыша с правой стороны, при малом увеличении микроскопа можно видеть ток крови в крупных кровеносных сосудах. Головной мозг уже подразделен на 5 отделов.

Наиболее наглядным и удобным для вскрытия является 4-дневный зародыш (рис. 78). На этой стадии он освобождается от желточной оболочки. Желток к этому моменту сильно разжижен, и его объем значительно увеличился за счет поступления жидкости из белковой оболочки. Учитывая эти два обстоятельства, надо очень осторожно выливать содержимое яйца в чашку Петри.

Зародыш становится крупнее, но в результате изгиба тела его общая длина все еще составляет около 7 мм. Зародыш лежит на левом боку. Его тело одето тонкой зародышевой оболочкой — амнионом.

Функция амниона защитная, так как он образует замкнутую полость вокруг зародыша, которая заполняется жидкостью, являющейся благоприятной средой для его развития. На этой стадии объем ее невелик и амнион довольно плотно прилегает к зародышу. Об образовании и строении амниона будет сказано ниже. Тело зародыша изогнуто таким образом, что передний мозг находится рядом с желудочком сердца. Можно различить основные отделы мозга (особенно выделяется своими большими размерами пузырь среднего мозга), хорошо пигментированные выпуклые глаза с хрусталиком и хориоидальной щелью (см. ниже с. 202), зачатки передних и задних конечностей. Легко можно наблюдать движение крови в кровеносных сосудах, которое, однако, нарушается, когда зародыш охлаждается. Хорошо видно ритмически сокращающееся сердце и кровеносные сосуды зародыша: спинную аорту, дуги аорты, межсегментные артерии и другие сосуды. В сосудистом поле желточного мешка, которое к этому времени покрывает 1/3 поверхности желтка, различимы более светлые вены, которые несут кровь, обогащенную кислородом и питательными веществами, к зародышу и более темные — артерии, несущие кровь от зародыша в желточный мешок. Сосудистая сеть желточного мешка имеет вид правильного круга, край которого очерчен краевой (терминальной) линией. Наиболее крупными сосудами являются отходящие от зародыша правая и левая желточные артерии, которые сильно разветвляются по направлению к периферии *area vasculosa*; к зародышу подходят правая и левая желточно-брыжеечные вены, передняя и задняя желточные вены. От заднебрюшной части зародыша в виде небольшого пузырька выступает аллантоис, в стенках которого тоже разветвляются кровеносные сосуды. Ал-

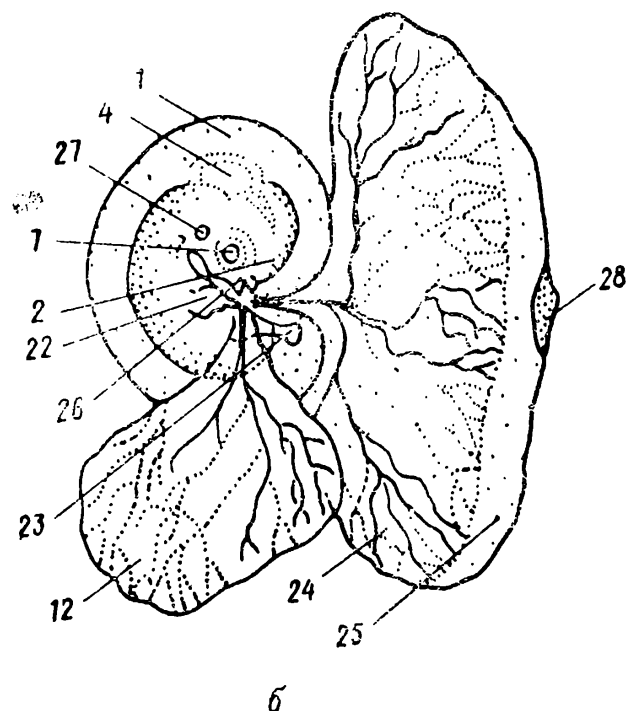
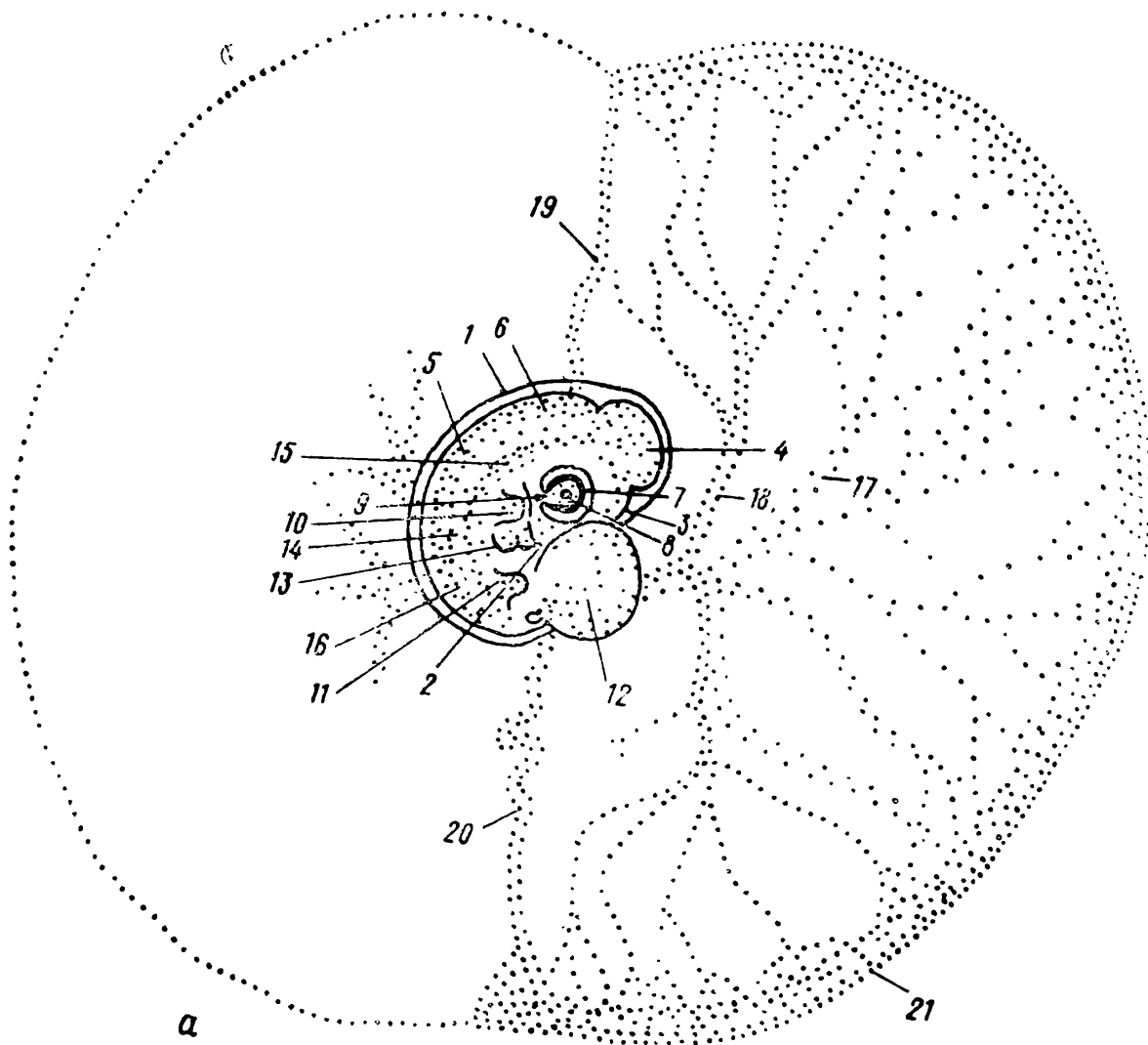


Рис. 78. Зародыши курицы на стадии 4 (а) и 7 (б) дней инкубации [Иванов, 1945].
(а — увеличено)

1 — амнион, 2 — передний мозговой пузырь, 3 — промежуточный мозг, 4 — средний мозговой пузырь, 5 — продолговатый мозг, 6 — задний мозг, 7 — зачаток глаза, 8 — хрусталик глаза, 9 — хоронда, 10 — почки передних и задних конечностей, 11 — аллантоис с сеточкой кровеносных сосудов, 12 — сердце, 13 — спинной мозг, 14 — аорта, 15 — дуги аорты, 16 — мезентерические и 17 — желточные артерии, 18 — желточно-брыжеечные вены, 19 — передняя и 20 — задняя желточные вены, 21 — краевая вена (синус), 22 — верхние конечности, 23 — нижние конечности, 24 — желточный мешок, 25 — area vitellina, 26 — клюв, 27 — слуховое отверстие, 28 — желток.

аллантаис — внезародышевый провизорный орган, выполняющий функцию мочевого мешка, куда выделяются продукты обмена первичными почками зародыша. (О строении аллантаиса см. ниже.)

Зародыш на стадии 7 сут инкубации достигает уже значительных размеров и отличается непропорционально большими головой и глазами (см. рис. 78, б). Особенно выделяется пузырь среднего мозга. На склере глаза по кругу располагаются так называемые склеральные сосочки, имеющие вид беловатых бугорков, число которых на этой стадии достигает 6. Это временные образования, которые позднее исчезают. Хорошо видны клюв и конечности, причем ноги превышают по своим размерам крылья. На поверхности кожи на спинной стороне и на уровне конечностей появляются ряды бугорков — зачатки перьев. Между головой и туловищем различается более узкий отдел — шея. Амнион окружает зародыш в виде большого пузыря, наполненного прозрачной жидкостью.

Аллантаис увеличивается в размерах и начинает распространяться по поверхности сосудистого поля желточного мешка (он уже покрывает более $1/3$ всей его поверхности). Кроме того, он вступает в связь с серозой — зародышевой оболочкой, возникающей одновременно с амнионом. Сероза, или хорион подстилает внутреннюю поверхность подскорлуповой оболочки над зародышем. Наружная стенка аллантаисного мешка срастается своим мезодермальным слоем с мезодермальным слоем серозы в результате этого формируется хорио-аллантаис с богатой сетью кровеносных сосудов, подстилающий подскорлуповую оболочку и скорлупу, к которому переходит дыхательная функция. При разрезании скорлупы сосуды хорио-аллантаиса повреждаются.

Сосудистое поле желточного мешка распространяется уже на большую часть поверхности желтка. Желток сильно разжижен, белковая масса уменьшилась и стала более густой. После 7 сут инкубации наблюдается неравномерный рост органов и в связи с этим изменение пропорций тела зародыша. Очертания головы становятся округлыми благодаря уменьшению выступа среднего мозга и закладке черепа. Удлиняется и утончается шея, рост глаз начинает отставать от роста головы, образуются веки. Клюв становится более мощным, увеличиваются ноги, крылья приобретают свои типичные черты. Продолжается нарастание общей массы тела. Развиваются покровы, появляются зачатки перьев, чешуи, когти.

На стадии 14 сут инкубации видно, что пропорции между отдельными частями туловища, головы и конечностей близки к окончательным вылупившегося цыпленка. Шея удлинилась, очертания головы стали округлыми, а клюв более мощным, на нем хорошо виден яйцевой зуб — возвышение на кончике клюва. Этот роговой «зуб» является провизорным образованием и служит цып-

ленку при вылуплении: с его помощью цыпленок разрывает оболочки и разламывает скорлупу яйца. Диспропорция в размерах глаз и головы уже не столь велика, как у более ранних зародышей. Глаза прикрыты веками так, что имеется только узкая щель, через которую проглядывает роговица. Зародыш полностью покрыт зародышевыми перьями, или пухом, который впоследствии у цыпленка заменяется дефинитивными перьями. Конечности полностью сформированы, на пальцах ног уже имеются когти. Амнион сильно растянут благодаря увеличению размеров зародыша и в связи с поступлением в него белка, который вместе с амниотической жидкостью заглатывается зародышем. Аллантоис разрастается по всей внутренней поверхности серозы и полностью покрывает зародыш с амнионом и желточным мешком, края аллантоиса смыкаются в области острого конца яйца на 10-е сутки развития зародыша. В стенке аллантоиса имеется

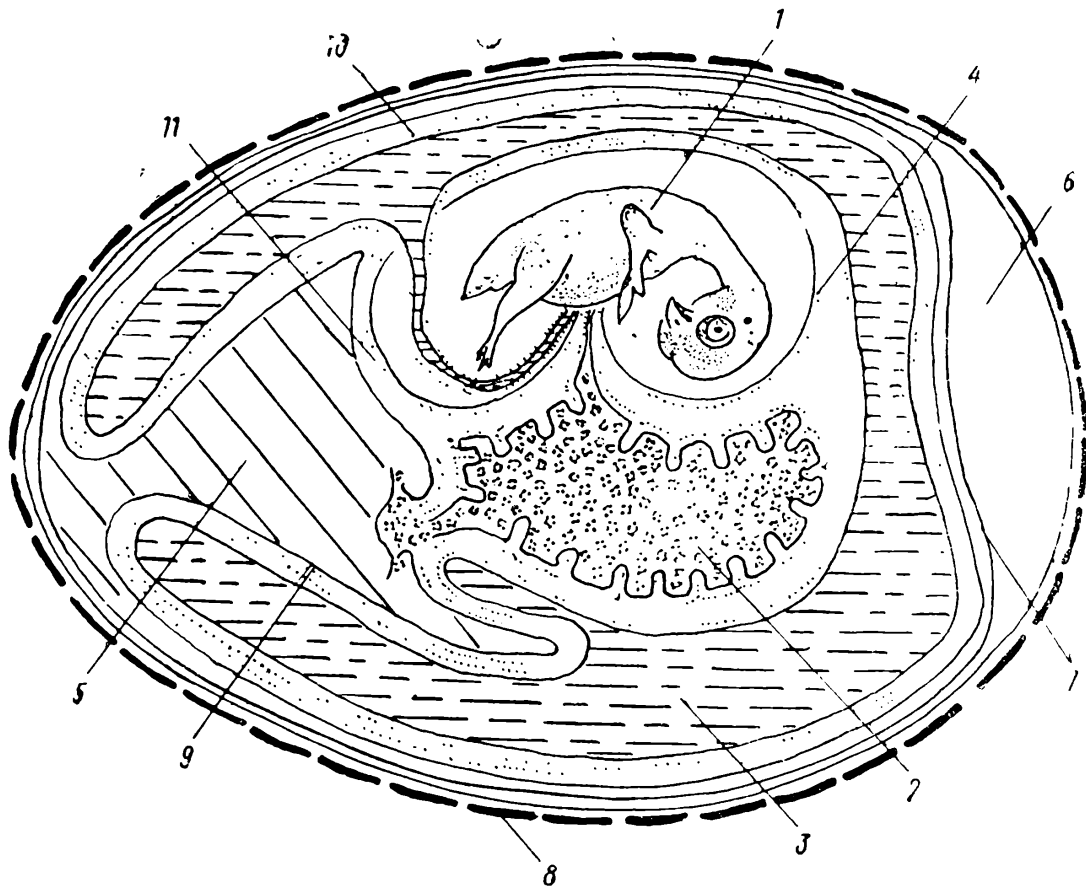


Рис. 79. Взаиморасположение зародыша курицы и его оболочек в яйце к 10 дню от начала инкубации (схема).

1 — зародыш, 2 — желточный мешок, 3 — аллантоис, 4 — амнион, 5 — белковый мешок, 6 — воздушная камера, 7 — подскорлуповые оболочки, 8 — скорлупа, 9 — сероза, 10 — хорио-аллантоис, 11 — серозо-амниотическое соединение.

богатая сеть кровеносных сосудов, среди которых различаются достаточно крупные так называемые пупочные вены и артерии. Количество жидкости в его полости увеличивается, наряду с этим в аллантоисной жидкости появляются беловатые слизистые

хлопья — меконий, выделяемый из кишечника в результате внутрикишечного переваривания заглоченного зародышем белка из полости амниона. Желточный мешок также полностью сформирован, объем его уменьшился в связи с потреблением желтка. Если посмотреть на стенку желточного мешка со стороны желтка, то видно, что она имеет складчатое строение, что обеспечивает ее более глубокое проникновение в толщу желтка.

Взаиморасположение зародыша и его оболочек к 10-му дню от начала инкубации можно видеть на рис. 79.

К 18-м суткам инкубации зародыш значительно увеличился в размерах и мало отличается от вполне сформировавшегося цыпленка. Все тело зародыша покрыто пухом. Желточный мешок сильно сократился в размерах, амнион плотно облегает тело зародыша, так как амниотической жидкости к этому времени не остается. Белок также поглощается зародышем. Аллантоис остается в прежнем состоянии, количество жидкости в нем несколько уменьшается.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для более детального изучения развития следует приготовить постоянные тотальные препараты и гистологические срезы зародышей.

Чтобы изготовить тотальный препарат необходимо снять бластодиск с поверхности желтка с помощью колец из фильтровальной бумаги.* Наружный и внутренний диаметры кольца определяются размерами бластодиска. Ширина кольца должна составлять приблизительно 3—4 мм.

Необходимо на некоторое время придать яйцу горизонтальное положение, чтобы бластодиск оказался наверху. Разбив корлупу яйца скальпелем, осторожно, не повреждая желточной оболочки, вылить его содержимое в чашку Петри. Если бластодиск окажется сбоку или снизу, добиться верхнего его положения можно, переливая желток из одной чашки в другую. Как правило, основная масса белка стекает с желтка при выливании яйца в чашку Петри; остатки белка нужно осторожно удалить тонким пинцетом, не повреждая желточной оболочки.

На тщательно очищенную от белка поверхность желточной оболочки накладывают заранее приготовленное кольцо из фильтровальной бумаги так, чтобы бластодиск оказался в центре кольца. Затем желточную оболочку обрезают по наружной окружности кольца тонкими и острыми ножницами. После этого пинцетом поднять за край кольцо вместе с прилипшим к нему бластодиском, осторожно перенести в чашку Петри с подогретым до 37 °С физиологическим раствором. Плавно перемещая кольцо в физиологическом растворе, бластодиск отмы-

* В. Н. Сорокин. Способ извлечения зародыша из инкубированного яйца. Авт. свид. № 100/399 с приоритетом от 19/XII.53.

вают от желтка и переносят в фиксатор на 10—15 мин. Следует помнить, что любое грубое или резкое движение при отмывании бластодиска от желтка может привести к отлипанию его от желточной оболочки, после чего фиксация его в расправленном состоянии усложняется.

При использовании этого способа снятия бластодиска с желтка применительно к неинкубированным яйцам или при длительности инкубации менее суток могут возникнуть известные затруднения, в связи со слабой адгезивностью бластодиска по отношению к желточной оболочке. Однако вполне удовлетворительные результаты получаются, если перед фиксацией ввести под бластодиск с помощью шприца 0,05—0,1 мл физиологического раствора. Иглу нужно вводить на некотором расстоянии от бластодиска, чтобы не повредить его. Создавшееся после инъекции жидкости под бластодиск давление обеспечивает достаточное сцепление зародыша с желточной оболочкой. Таким же образом можно ввести фиксатор под бластодиск. Часто капают фиксатор на желточную оболочку поверх бластодиска непосредственно перед снятием последнего с желтка. Но в этом случае возникает ряд неудобств для последующей работы: из-за фиксации оставшегося на поверхности желточной оболочки белка последняя теряет прозрачность, что затрудняет ориентировку зародыша. Кроме того, может зафиксироваться и слой желтка под бластодиском. Последующее отделение желтка очень затруднительно и грозит повреждением зародыша, объект окажется непригодным для изготовления тотальных препаратов, так как при окраске желток и белок маскируют зародыш, но пригоден для приготовления срезов.

В качестве фиксатора для приготовления тотальных препаратов могут быть использованы любые часто употребляемые фиксирующие смеси, особенно удобна фиксация смесями Карнуа или спирта с уксусной кислотой (3 : 1), так как упрощается последующая обработка объекта.

Зафиксированный зародыш с кольцом переносят в 96%-ный спирт для промывки и затем через 70%-ный спирт доводят до воды и окрашивают. В качестве красителя для тотальных препаратов можно рекомендовать квасцовый гематоксилин Майера или борный кармин по Гренахеру [Роскин, Левинсон, 1957]. После отмывки от красителя материал обезвоживают в спиртах. В 70- или 96%-ном спирте нужно освободить объект от кольца с помощью препаровальных игол, так как при дальнейшем обезвоживании зародыши становятся хрупкими. Материал доводят до ксилола через изобутиловый спирт или карбол-ксилол и заключают в густой бальзам или полистирол. Под покровное стекло необходимо подложить «ножки» достаточной высоты, чтобы избежать раздавливания зародыша при высыхании бальзама.

Для изготовления гистологических срезов после отмывки от

фиксатора объект обезживают в спиртах восходящей концентрации, затем проводя через хлороформ, заливают в парафин. Изготавливают срезы толщиной 6—7 мкм. Для получения обзорных препаратов срезы можно красить каким-либо из квасцовых гематоксилинов с докраской эозином.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Бластодиск отложенного, но еще не инкубированного яйца (отальный препарат). От момента оплодотворения яйцеклетки до откладки яйца проходит около 24 ч. Таким образом, ранние стадии эмбрионального развития (дробления и бластулы) зародыш проходит в организме курицы при продвижении яйца в яйцеводу. В это время зародыш претерпевает частичное диссоциальное дробление. Первые три борозды дробления проходят в радиальном направлении, затем возникают широтные и меридиальные борозды, бластомеры оказываются различной величины. В их взаиморасположении нет правильности и постоянства. В результате дробления образуется многослойный бластодиск, налегающий на желток. По краю бластодиска и под ним в это время остаются клетки, не полностью отделенные от желтка — мероциты, образующие в совокупности перибласт (парабласт), от которого продолжается отделение полностью отграниченных клеток, входящих в состав бластодиска. Часть ядер клеток перибласта уходит в глубь желтка, как и ядра избыточных сперматозоидов. Под влиянием клеток бластодиска и мероцитов часть желтка под зародышем разжижается, образуя подзародышевую полость.

Дробление завершается образованием дискобластулы, крыша которой представлена многослойным эпителиоподобным пластом клеток — бластодермой, дно — нераздробившейся массой желтка с ядрами перибласта, бластоцелю на этой стадии соответствует подзародышевая полость. Так как деление ядер краевых клеток перибласта не всегда сопровождается делением цитоплазмы, в периферической части бластодиска скапливается довольно большое число ядер. Этот участок перибласта образует кольцо так называемого зародышевого вала. В результате дальнейшего роста край бластодиска (край обрастания желтка) надвигается на желток за пределами зародышевого вала, опираясь непосредственно на желток.

Кроме того, еще до откладки яйца от бластодермы начинают отделяться клетки, которые объединяются в непрерывный слой, лежащий на дне подзародышевой полости. Таким образом, бластодиск становится двуслойным, его верхний пласт получил название эпибласта, а нижний — первичного гипобласта. Позднее образуется второе поколение клеток гипобласта (вторичный гипобласт), оттесняющий первичный к периферии. Первичный и вторичный гипобласт вместе с клетками зародышевого вала

представляют собой желточную энтодерму, но содержат также (в серповидной зоне спереди) первичные половые клетки — гонобласт. Обособление этих двух клеточных пластов представля-

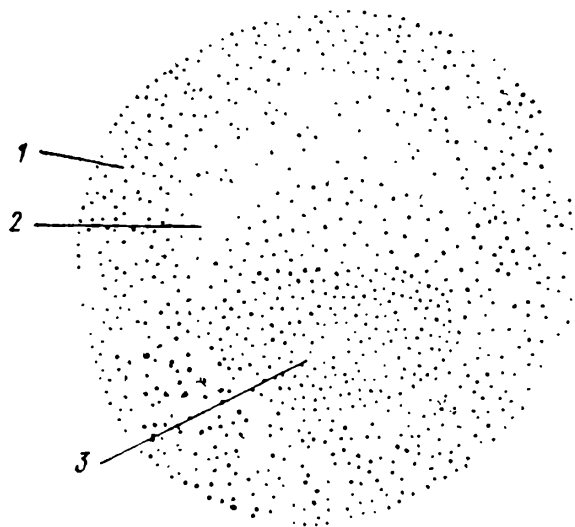


Рис. 80 Бластодиск отложенного, но еще не инкубированного яйца [Hamburger, Hamilton, 1951].

1 — area opaca, 2 — area pellucida, 3 — зародышевый щиток.

ет собой 1-ю фазу гастрюляции. На тотальном препарате бластодиска неинкубированного яйца (рис. 80) различаются более светлая центральная часть — агеа pellucida, и более темная краевая часть — агеа опаса. Различие в окраске объясняется тем, что в агеа pellucida находится эпибласт, состоящий из одного слоя бедных желтком клеток, сквозь который просвечивает подзародышевая полость, а в агеа опаса клетки располагаются в нескольких слоев и лежат непосредственно на желтке.

В задней трети агеа pellucida можно видеть неболь-

шой неясно очерченный, более интенсивно окрашенный участок — зародышевый щиток. Это утолщение эпибласта, из которого в дальнейшем формируется тело самого зародыша. Остальные части агеа pellucida и вся агеа опаса являются внезародышевыми частями.

Стадия окончательно сформированной первичной полоски (тотальный препарат). К 18—19 ч инкубации в области зародышевого щитка путем перемещения клеток образуется первичная полоска. Она располагается вдоль средней линии и занимает $2/3$ или $3/4$ агеа pellucida, которая в это время принимает грушевидную форму (рис. 81, а). На переднем конце первичной полоски имеется утолщение — гензеновский узелок, в центре которого появляется углубление — первичная ямка. Медианно по всей длине первичной полоски проходит первичная бороздка, являющаяся продолжением первичной ямки.

Работами Розенквиста и Николе с применением методов радиоактивного мечения зародышей с последующей трансплантацией частей этих зародышей показано, что еще до образования гензеновского узелка из передней части первичной полоски выходят клетки, образующие кишечную энтодерму, которая постепенно оттесняет гипобласт на периферию агеа pellucida.

Клетки, которые выселяются внутрь со дна первичной бороздки, расходятся латерально (рис. 81, б), образуя средний зародышевый листок — мезодерму. Благодаря сгущению кле-

блочно́го материала и бо́льшей высоте клеток первичная полоска и гензеновский узелок на тотальном препарате оказываются крашенными темнее, чем остальная часть *area pellucida*, тогда как первичная ямка и первичная бороздка выглядят светлыми. На заднем конце первичная полоска заканчивается расширением, не всегда ясно видимым, называемым первичной пластинкой.

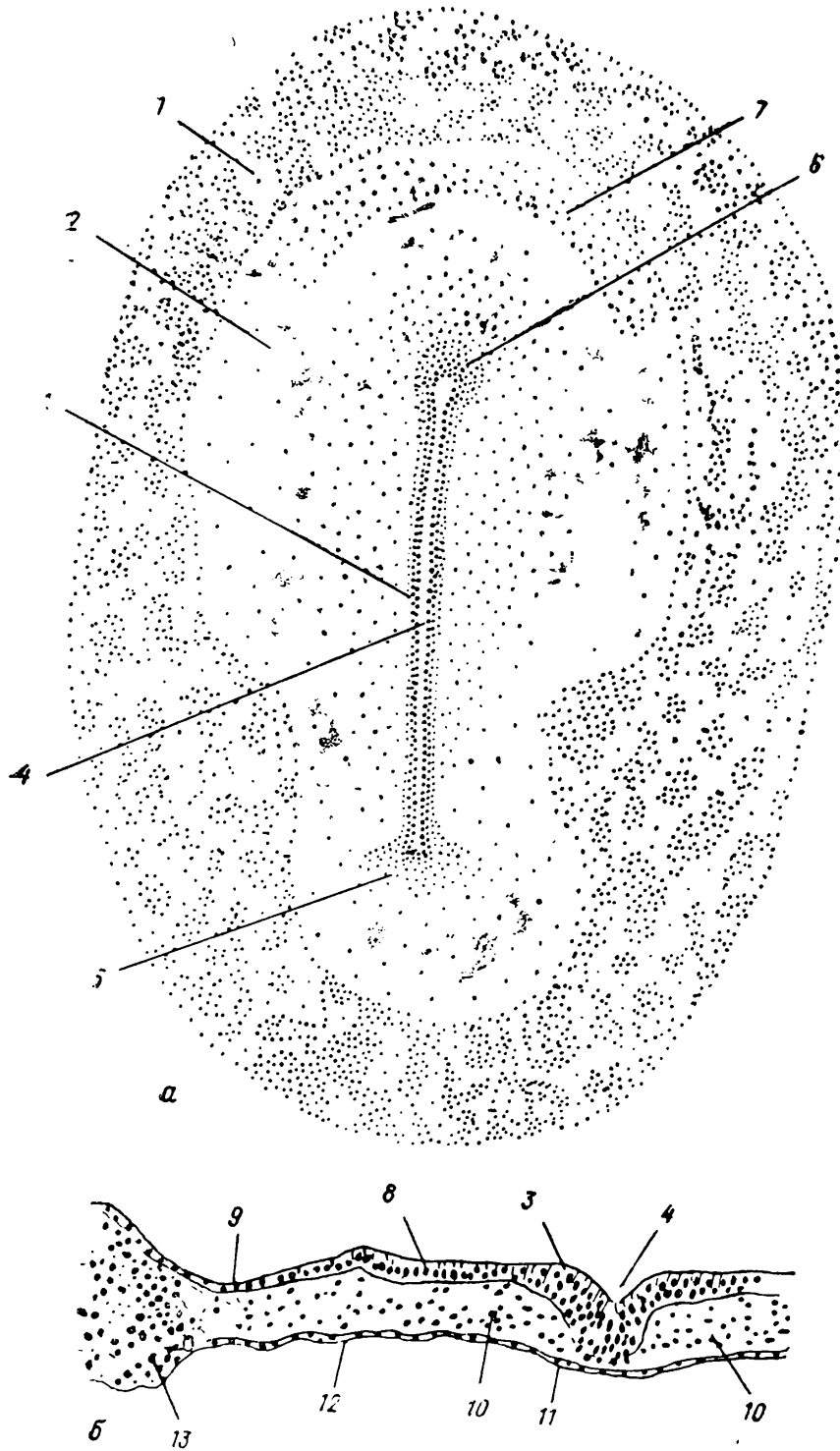


Рис. 81. Зародыш на стадии первичной полоски.

а — тотальный препарат [Hamburger, Hamilton, 1951], б — поперечный срез [Hamilton, 1951]; 1 — *area opaca*, 2 — *area pellucida*, 3 — первичная полоска, 4 — первичная бороздка, 5 — первичная пластинка, 6 — гензеновский узелок, 7 — зачатковый серп (гонобласт), 8 — зародышевая эктодерма, 9 — внезародышевая эктодерма, 10 — мезодерма, 11 — зародышевая энтодерма, 12 — внезародышевая энтодерма, 13 — зародышевый вал.

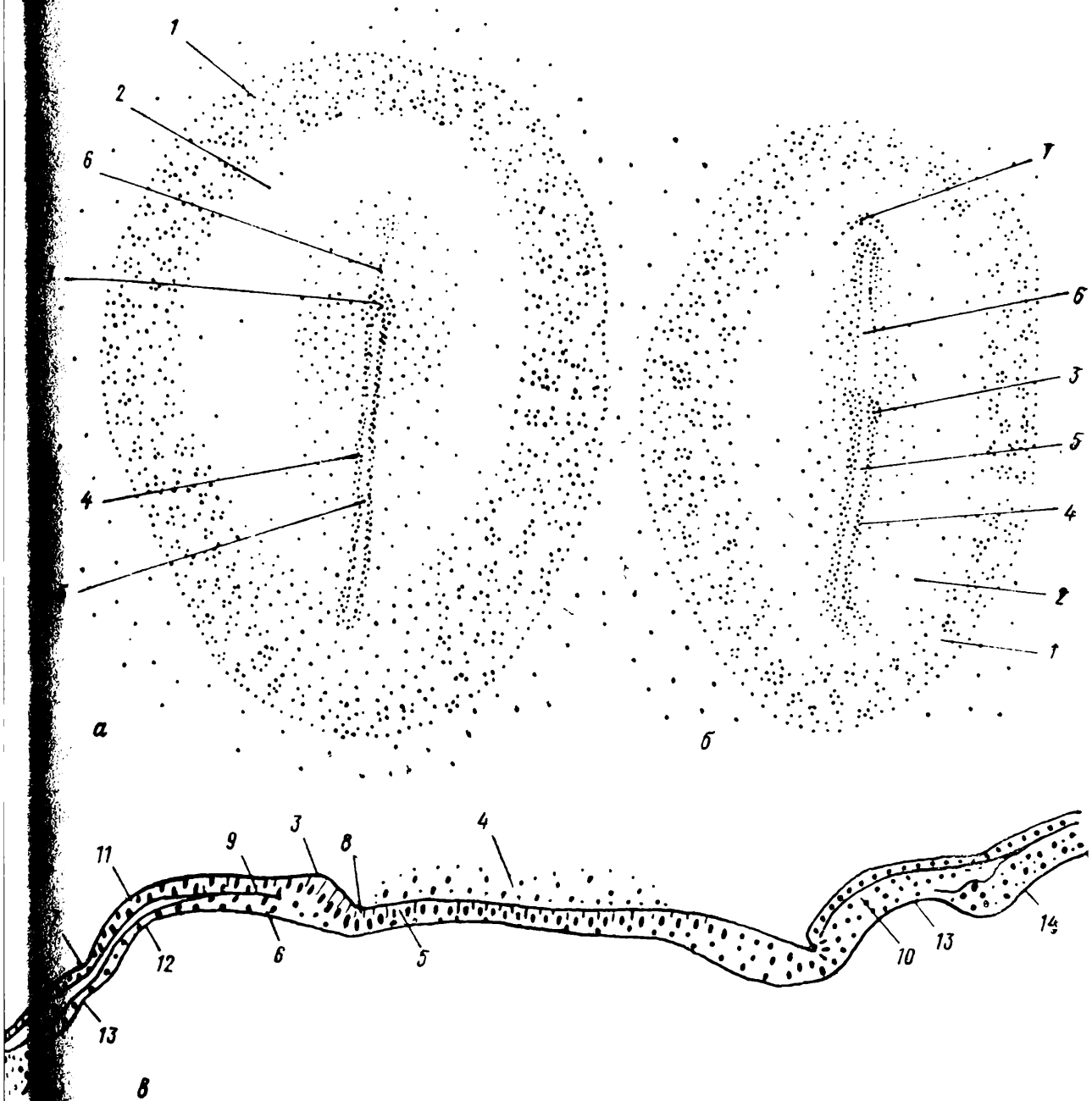
Стадия сформировавшейся первичной полоски (поперечный срез). На поперечном срезе бластодиск имеет вид двуслойной полоски (рис. 81, б), верхний слой которой представляет собой эпибласт, а нижний — гипобласт. В средней части эпибласти виден утолщенный участок — это перерезанная поперек первичная полоска. По краям среза видны утолщенные участки области агеа ораса — зародышевый вал. Рассматривая срез при большом увеличении, можно видеть, что толщина верхнего слоя клеток — эпибласти — на его протяжении различна. В области первичной полоски находятся наиболее высокие клетки, ядра которых расположены на разных уровнях, в результате чего создается впечатление ложной многорядности. Высота клеток уменьшается по направлению к периферии среза, они переходят в кубические клетки эктодермы зародыша, которая без четкой границы продолжается во внезародышевую эктодерму с еще более низкими клетками. В средней части первичной полоски видна впадина — так выглядит перерезанная поперек первичная бороздка, из нее происходит выселение клеток мезодермы, которые распространяются между эпи- и гипобластом латерально, образуя рыхлый слой. Нижний слой плоских клеток представляет собой зародышевую энтодерму, которая переходит на краях среза во внезародышевую энтодерму и зародышевый вал. Клетки последнего содержат большое количество желтка.

Стадия формирования головного отростка (тотальный препарат). На рис. 82, а представлен препарат, демонстрирующий начало образования головного отростка (19—22 ч инкубации). Головной отросток представляет собой материал будущей хорды, который через первичную ямку уходит внутрь и образует под эпибластом направленный вперед плотный клеточный тяж. Головной отросток просвечивает через верхний слой клеток впереди гензеновского узелка.

Предполагают, что до образования головного отростка материал хорды располагается в эпибласте непосредственно перед гензеновским узелком, образуя так называемую хордальную пластинку, а впереди от нее лежит нервная пластинка — материал будущей нервной трубки. По мере того, как клетки хордальной пластинки проходят через первичную ямку, головной отросток удлиняется, гензеновский узелок отодвигается назад, а первичная полоска укорачивается. В конце концов весь материал хордальной пластинки уходит внутрь; оставшаяся снаружи часть эпибласти представляет собой эктодерму, причем непосредственно над зачатком хорды оказывается зачаток нервной трубки.

Все эти процессы, приводящие к обособлению эктодермы, кишечной энтодермы, мезодермы и хорды, составляют 2-ю фазу гастрюляции. Передний край первичной ямки, через который проходит материал хорды, соответствует дорсальной губе бла-

блестящего, а боковые стенки первичной бороздки, из которой мигрируют внутрь клетки мезодермы, соответствуют боковым гу-



82. Зародыши курицы на разных стадиях формирования головного отростка.

а — начало образования головного отростка (а) и головной складки (б) [Hamburger, Hamilton, 1951], в — медианный срез зародыша на стадии головного отростка [Hamburger, 1952]; 1 — область бластопо́ра, 2 — область pellucida, 3 — гензеновский узелок, 4 — первичная бороздка, 5 — первичная бороздка, 6 — головной отросток, 7 — головная складка, 8 — первичная ямка, 9 — нервная и хордальная пластинка, 10 — первичная пластинка, 11 — зародышевая эктодерма, 12 — зародышевая энтодерма, 13 — внезародышевая энтодерма, 14 — зародышевый вал.

и бластопора. В свете современных экспериментальных данных карта презумптивных зачатков в эпибласте курицы в начале 2-й фазы гаструляции выглядит, как показано на рис. 83. В 23—25 ч инкубации (рис. 82, б) протяженность головного от-

ростка составляет уже половину длины зародыша, гензеновский узелок отодвинут к середине его тела, позади узелка видна первичная полоска с первичной бороздкой. На переднем конце

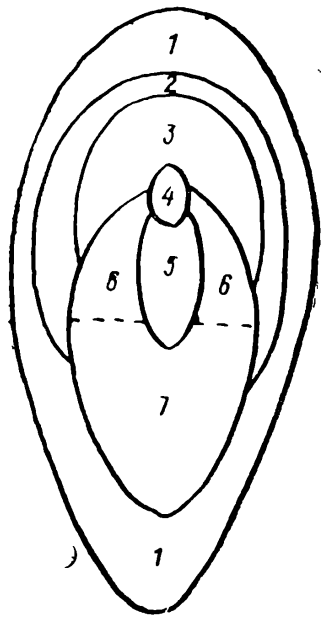


Рис. 83. Карта презумптивных зачатков птиц (по: Rosenquist, 1966).

1 — внезародышевая эктодерма, 2 — зародышевая эктодерма, 3 — нервная пластинка, 4 — хорда, 5 — зародышевая энтодерма, 6 — параосевая мезодерма, 7 — спланхнотом.

зародыша, несколько впереди головного отростка располагается так называемая головная складка, состоящая из эктодермы и энтодермы. На препарате виден ее полукруглый контур. Головная складка направлена под зародыш и растет назад. Она дает начало передней кишке. С появлением этой складки начинается обособление зародыша от остальной части *area pellucida* и от желтка; позднее образуется хвостовая и боковые туловищные складки. В результате образования хвостовой складки на заднем конце зародыша начинается смыкание кишечной энтодермы в трубку задней кишки. Постепенно процесс образования кишечной трубки распространяется от обоих концов зародыша к середине, в результате ее участок, сообщающийся с желтком, постепенно уменьшается, и, в конце концов, связь между зародышем и желтком осуществляется через узкий и длинный пупочный канатик.

Стадия головного отростка (медианный срез). Для того чтобы получить правильную картину взаиморасположения

материала головного отростка, гензеновского узелка и первичной полоски вдоль тела зародыша, необходимо изготовить строго продольные срезы, при этом надо помнить, что из серии срезов лишь немногие проходят через медианную область. На узкой полоске среза можно различить более утолщенный передний конец зародыша (рис. 82, в). Здесь внезародышевая эктодерма, состоящая из невысоких кубической формы клеток, переходит в эпителиоподобный пласт высоких тесно расположенных столбчатых клеток нервной и хордальной пластинок. Хордальная пластинка оканчивается перед небольшим возвышением, образующим гензеновский узелок, за которым следует впадина первичной ямки и первичная полоска с первичной бороздкой, заканчивающаяся сзади массивным скоплением клеток первичной пластинки. Эпителиальное расположение клеток первичной полоски и первичной пластинки утрачивается. Впереди от гензеновского узелка под эпибластом находится масса клеток, составляющая головной отросток. Нижний, энтодермальный слой плоских клеток на переднем и заднем концах продолжается во внезародышевую энтодерму зародышевого вала. На зад-

м конце зародыша из первичной пластинки мезодермальные клетки мигрируют в область агеа ораса — это внезародышевая мезодерма. Все три клеточных пласта плотно примыкают друг другу. Головной отросток в начале своего образования сливается с подстилающей его энтодермой. На переднем конце зародыша видно небольшое углубление, которое знаменует начало образования головной складки.

В результате дальнейшего удлинения головного отростка первичная полоска все больше укорачивается и, в конце концов, весь материал хордальной пластинки и первичной полоски уходит внутрь, образуя средний зародышевый слой. Снаружи остаются только нервная пластинка, сильно вытянутая в длину достигшая дорсальной губы бластора, и кожная эктодерма, пределами зародыша переходящая во внезародышевую эктодерму. Задолго до полного исчезновения первичной полоски нервная пластинка прогибается в виде желобка, края ее приподнимаются, образуя нервные валики, которые постепенно сближаются навстречу друг другу. Нервная пластинка свертывается в трубку, а нервные валики, срастаясь, образуют ганглиозную пластинку, располагающуюся над нервной трубкой, кожная эктодерма смыкается над ними. Этот процесс осуществляется постепенно в направлении спереди назад; его последовательные стадии можно видеть при сравнении рис. 84, а и б, также из серии поперечных срезов (см. рис. 85, а, б).

Стадия ранней нейрулы (тотальный препарат, 26—29 ч инкубации). На препарате (рис. 84, а) видны нервные валики в форме двух продольных полосок. На переднем конце зародыша нервные валики уже сближены. Ранее всего замыкание нервной пластинки в трубку происходит на уровне среднего мозга, позднее — в области переднего, в связи с большим объемом переднего мозгового пузыря. Одновременно с формированием нервной трубки мезодерма дифференцируется на расположенные по бокам от хорды массивные участки — сомиты, лежащие латеральнее их сегментные ножки — нефротомы (зачатки выделительной системы) и наиболее латерально расположенные спланхнотомы или боковые пластинки. Сомиты и нефротомы — сегментированные части мезодермы, а спланхнотомы не сегментируются, а расслаиваются на два листка наружный (паранетальный) и внутренний (висцеральный), образующаяся между ними полость представляет собой целом. Оба листка продолжаются во внезародышевую мезодерму, участвующую наряду с экто- и энтодермой в обрастании желтка. На рассматриваемом препарате видны 4 пары сомитов (нервные валики заканчиваются на уровне 4-й пары), позади которых располагаются несегментированная мезодерма, гензеновский узелок и зачатки первичной полоски. В области головного конца зародыша просвечивает передняя кишка, широкий вход в которую — передние кишечные ворота — очерчен в виде крутого

полумесяца. *Area pellucida* имеет теперь форму вытянутой восьмерки, в задней части *area* ораса видны темно окрашенные кровяные островки, означающие начало образования внезародышевого сосудистого поля (*area vasculosa*).

Стадия поздней нейрулы на тотальном препарате (29—30 ч инкубации). В ходе дальнейшего развития зародыша продолжают процессы сегментации мезодермы (на рассматриваемой стадии развития число сомитов достигает 9 пар, (рис. 84, б) и образования нервной трубки. Передний отдел нервной трубки представляет собой зачаток головного мозга, простирающийся до 4-й, 5-й пары сомитов, которые входят в состав головы. Эмбриональный мозг перетяжками подразделяется на три отдела неравной длины: передний, средний и задний мозговые пузыри. Передний образует боковые выпячивания — зачатки глазных пузырей, задний мозговой пузырь без резкой границы переходит в спинной мозг. Позади последнего сформировавшегося сомита нервные валики еще широко раздвинуты, они постепенно уплощаются и сливаются с эктодермой по бокам первичной полосы. Передний конец тела обособлен от желтка благодаря продолжающемуся вращению под зародыш головной складки,

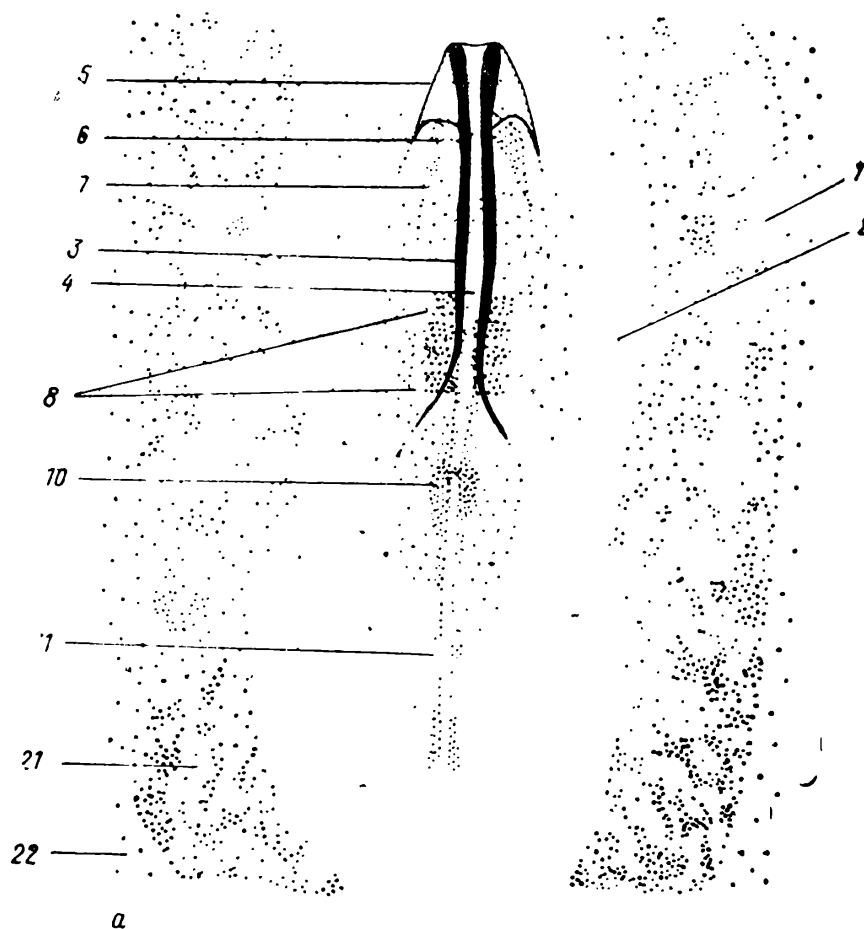
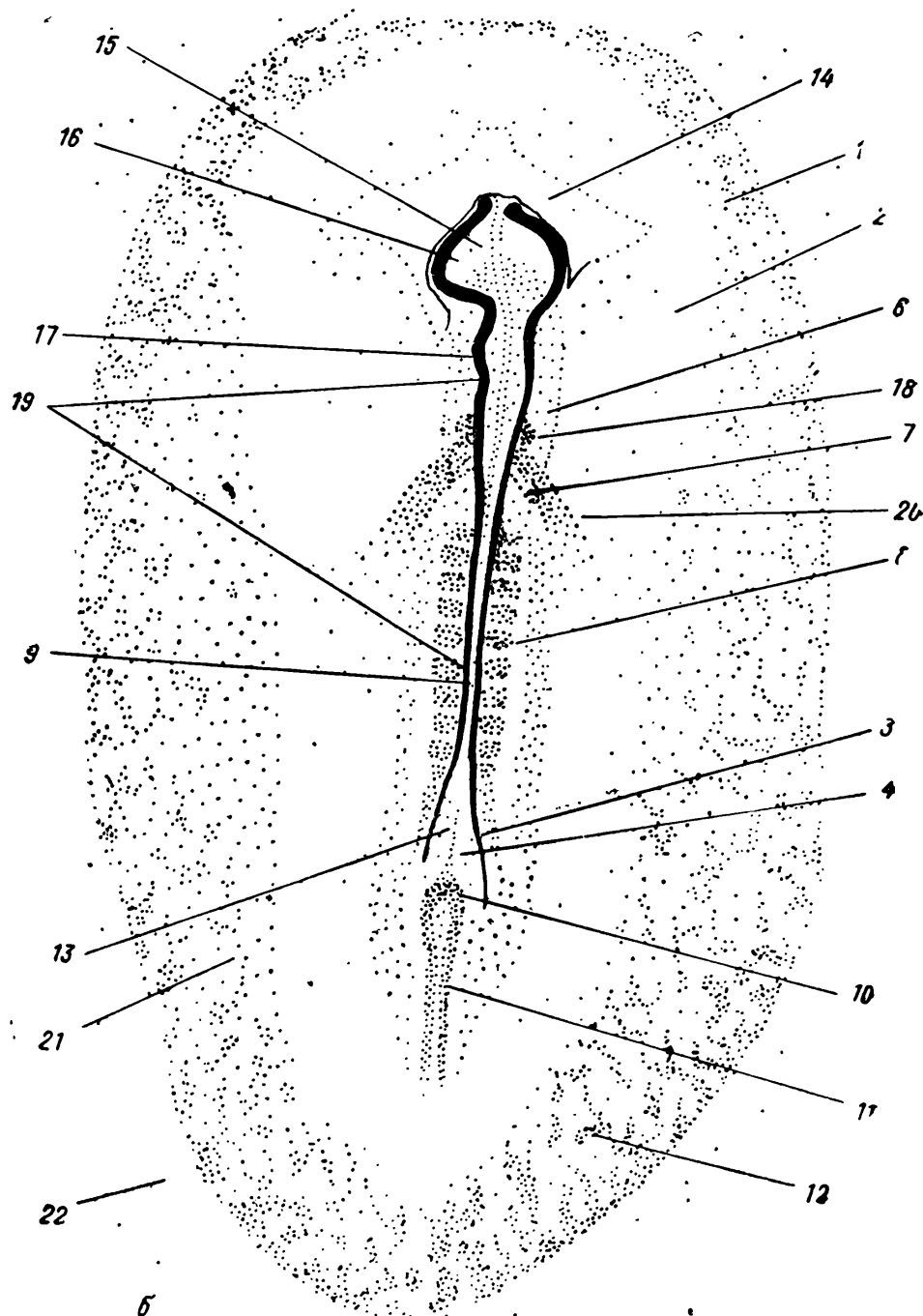


Рис. 84. Зародыш курицы на стадиях ранней (а) и поздней (б) нейрулы. 1 — *area* ораса, 2 — *area pellucida*, 3 — нервные валики, 4 — передние кишечные ворота, 5 — сомиты, 6 — нервная трубка, 7 — кровяные островки, 8 — хорда, 9 — проамнион, 10 — передний мозговой пузырь, 11 — зачаток сердца, 12 — задний мозговой пузырь, 13 — средний мозговой пузырь, 14 — передний мозговой пузырь, 15 — зачаток желудка, 16 — зачаток кишечника, 17 — зачаток печени, 18 — зачаток поджелудочной железы, 19 — зачаток поджелудочной железы, 20 — зачаток поджелудочной железы, 21 — зачаток поджелудочной железы, 22 — зачаток поджелудочной железы.

результате чего передняя кишка увеличивается в длину. На с. 84, б очерчиваются ее боковые контуры и передние кишечные ворота, которые находятся на одном уровне с образовавшейся к этому времени сердечной трубкой.

Продолжается формирование сосудистого поля (*area vasculosa*) в области *area* ораса, граничащей с *area pellucida*. Упомянутые ранее кровяные островки представляют собой



Задней (б) нейрулы [Hamburger, Hamilton, 1951].

1 — передняя пластинка, 5 — стенка тела, 6 — передняя кишка, 7 — узелок, 11 — первичная полоска, 12 — кровяной пузырь, 16 — глазной пузырь, 17 — средний мозговой желточные вены, 21 — *area vasculosa*, 22 — *area vitellina*.

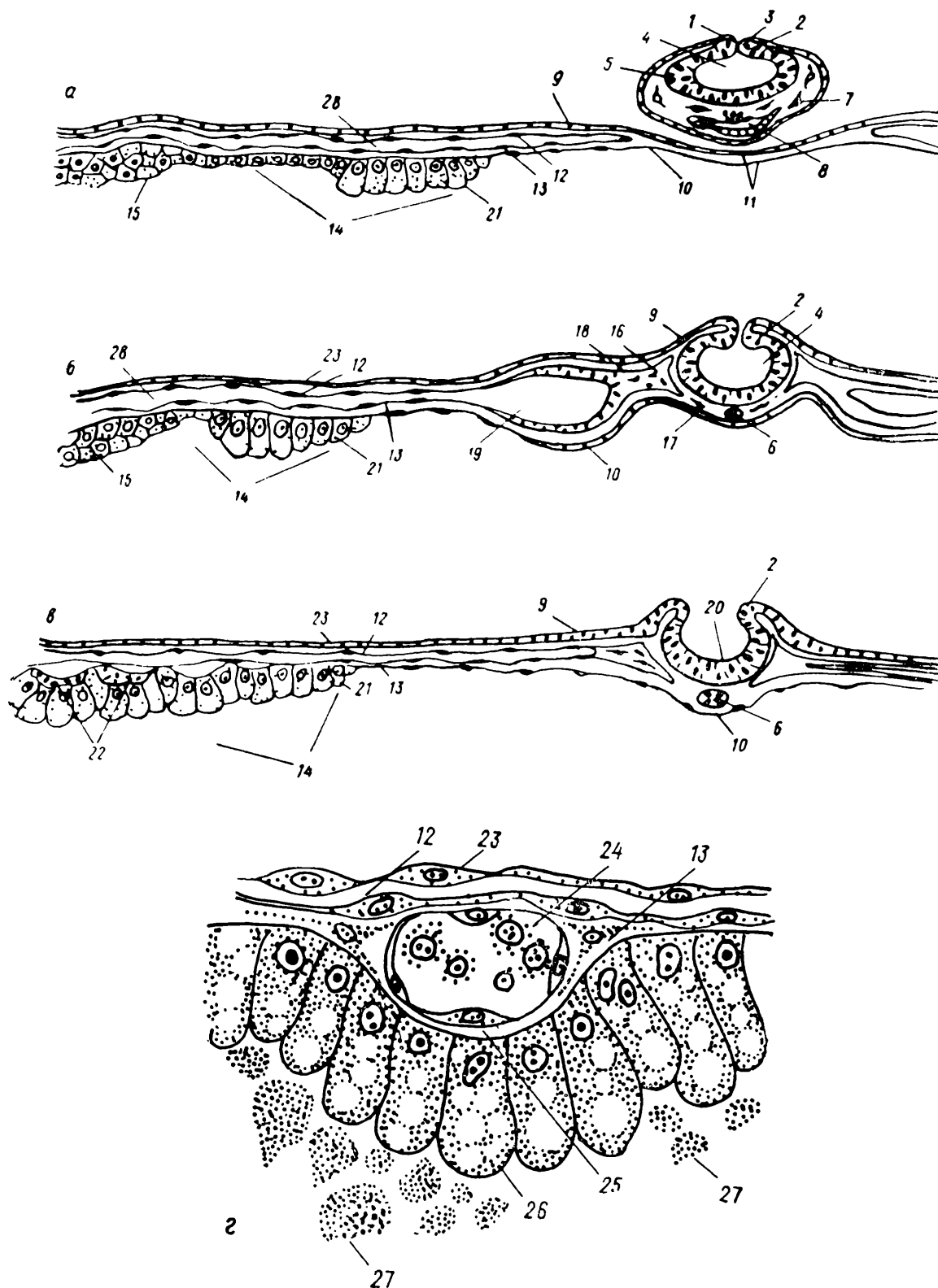


Рис. 85. Зародыш курицы на стадии поздней нейрулы [Hamilton, 1952]

а — г — поперечные срезы (а — на уровне головной кишки, б — передних кишечных
рот, в — хвостового отдела, г — участок стенки желточного мешка — Кнорре, 1959):
нейральный гребень, 2 — нервные валики, 3 — шов в месте схождения нервных ва-
ликов, 4 — мозговая трубка, 5 — глазной пузырь, 6 — хорда, 7 — головная мезенхима,
глотка, 9 — зародышевая эктодерма, 10 — зародышевая (кишечная) энтодерма, 11 —
амнион, 12 — париетальный листок спланхнотомы, 13 — висцеральный листок сплан-
хнотомы, 14 — желточный мешок, 15 — зародышевый вал, 16 — сомит, 17 — передняя ки-
шка, 18 — ножка сомита, 19 — перикардальная полость, 20 — нервная пластинка, 21 — ви-
родышевая (желточная) энтодерма, 22 — кровяные островки, 23 — внезародыше-
вая эктодерма, 24 — кровяные клетки, 25 — эндотелий кровеносных сосудов, 26 — жа-
гельчатый эпителий, 27 — желток, 28 — экзоцель.

скопления мезенхимных клеток; позднее периферический слой клеток каждого такого скопления отделяется от центральной массы и образует эндотелиальную стенку кровеносного сосуда, а клетки центральной массы дифференцируются в первичные эритробласты. Кровяные островки анастомозируют друг с другом, образуя сеть кровяных капилляров. Таким же образом формируются из мезенхимы и кровеносные сосуды в теле зародыша.

Первыми образуются крупные внезародышевые сосуды, связанные с сердцем, — желточные вены. По мере обособления передней части тела зародыша от желтка желточные вены оказываются внутри тела и называются теперь желточно-брыжечными венами. В это же время начинается формирование сердца в виде парных мезенхимных закладок.

Стадия поздней нейрулы (поперечные срезы). Зародыш на стадии поздней нейрулы, на разных уровнях отличается по своему строению. Мы рассмотрим три из них. Так как многие формообразовательные процессы начинаются на переднем конце и постепенно распространяются назад, то на передних уровнях можно видеть более поздние стадии этих процессов.

На поперечном срезе, прошедшем на уровне головной кишки (рис. 85, а), при малом увеличении микроскопа видна узкая двуслойная полоска. Это нижняя стенка головной складки. В центральной части среза над этой полоской располагается перерезанный поперек головной конец зародыша. Только что произошло замыкание мозговой трубки в области переднего мозга. В результате сближения нервных валиков образуется нейральный гребень, расположенный над нервной трубкой (ганглиозная пластинка). Виден шов в месте схождения нервных складок. Боковые выпячивания стенки мозговой трубки представляют собой зачатки глазных пузырей, которые у основания широко открыты в мозговую трубку. Клетки мозговой трубки высокие и плотно расположены, так, что их ядра оказываются на разных уровнях, создавая впечатление ложной многорядности. Под мозговой трубкой находится хорда в виде рыхлой массы плотно расположенных клеток, под ней — глоточный отдел передней кишки в виде сплюсненной в дорсо-вентральном направлении трубки. Эти зачатки окружены клетками рыхлой головной мезенхимы. Подстилает головной отдел нижний листок головной складки, состоящий из эктодермального и энтодермального слоев, мезодерма в него не заходит (проамнион), а в боковых частях среза видны целомические полости, ограниченные париетальным и висцеральным листками мезодермы. Энтодермальный слой под зародышем представляет собой тонкий пласт сильно уплощенных клеток кишечной энтодермы. В области агеа ораса клетки энтодермы выглядят иначе: это крупные высокие клетки, набитые желтком. Их ядра оттеснены к основанию клеток и содержат большие хорошо видимые яд-

рышки. Это клетки желточной энтодермы, которая вместе с висцеральной мезодермой, распространяясь по поверхности желтка, образует желточный мешок (рис. 85, г). В боковых частях энтодермального слоя богатые желтком клетки лежат в несколько рядов, образуя зародышевый вал.

На поперечном срезе на уровне передних кишечных ворот зародыш (рис. 85, б) имеет хорошо видимое расширение в центральной части, соответствующее телу зародыша. Срез можно рассматривать при малом увеличении микроскопа. На этом уровне мозговая трубка еще не замкнута, в области нервных валиков ее края переходят в кожную эктодерму. Под нервной трубкой находится перерезанная поперек хорда. По бокам нервной трубки и хорды видны рыхлые скопления мезодер-

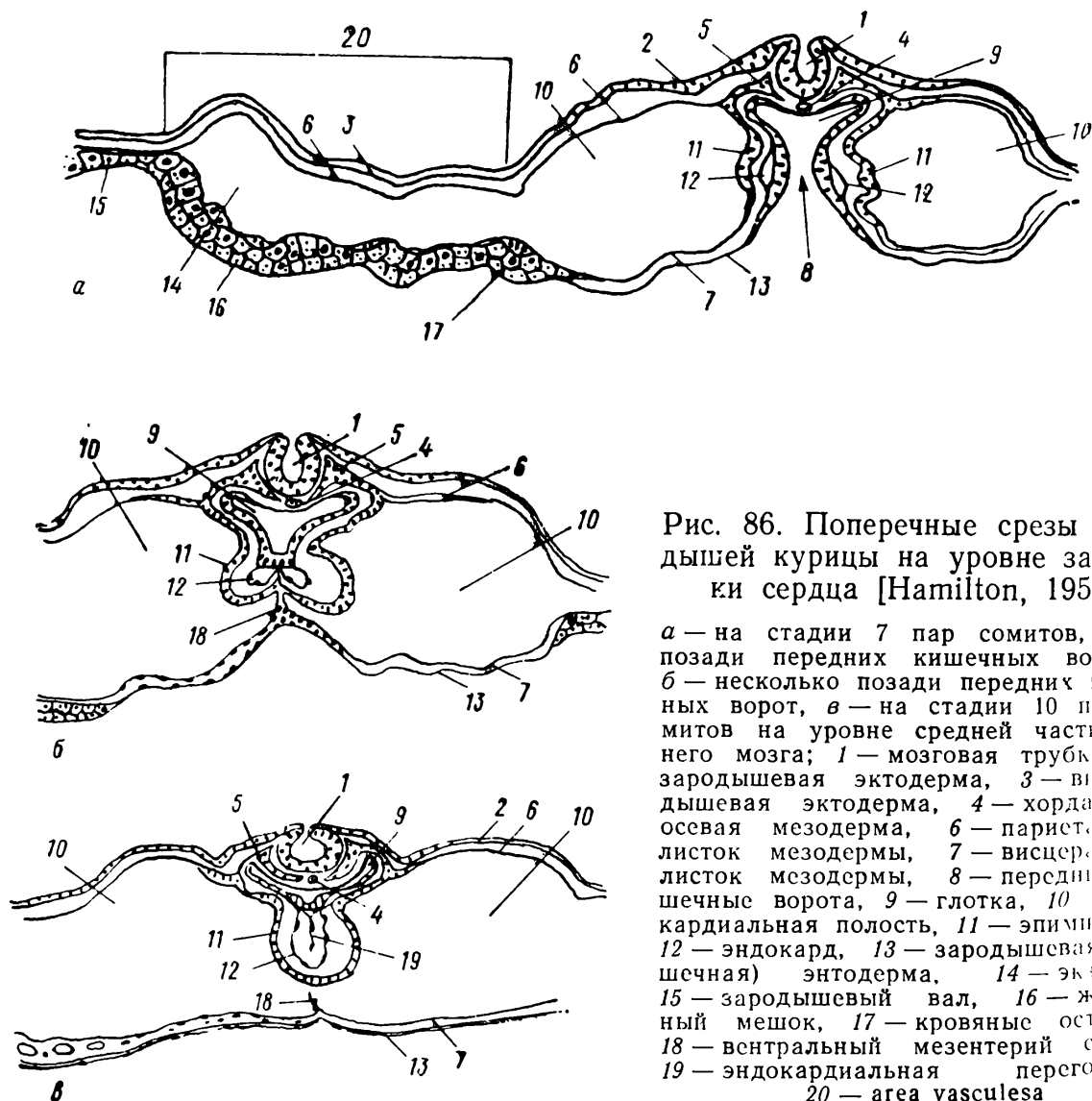


Рис. 86. Поперечные срезы зародышей курицы на уровне закладки сердца [Hamilton, 1952].

а — на стадии 7 пар сомитов, сразу позади передних кишечных ворот, б — несколько позади передних кишечных ворот, в — на стадии 10 пар сомитов на уровне средней части заднего мозга; 1 — мозговая трубка, 2 — зародышевая эктодерма, 3 — висцеральная эктодерма, 4 — хорда, 5 — осевая мезодерма, 6 — париетальный листок мезодермы, 7 — висцеральный листок мезодермы, 8 — передние кишечные ворота, 9 — глотка, 10 — кардиальная полость, 11 — эпимезодерма, 12 — эндокард, 13 — зародышевая (висцеральная) энтодерма, 14 — эктодерма, 15 — зародышевый вал, 16 — желточный мешок, 17 — кровяные островки, 18 — вентральный мезентерий сердца, 19 — эндокардиальная перегородка, 20 — area vasculosa

мальных клеток, образующие сомиты, которые продолжают в ножку сомита, имеющую вид узкого клеточного тяжа; последний, в свою очередь, переходит в спланхнотом. Париетальный листок спланхнотомы (соматоплевра) примыкает к кожной эк-

энтодерме, а висцеральный листок (спланхноплевра) — к энтодерме. Медианные части целомической полости на этом уровне являются зачатком перикардальной полости (см. ниже). Кишечная энтодерма выгибается кверху по направлению к хорде в виде желобка, образуя переднюю кишку, которая на этом уровне еще не замкнута и открыта в сторону желтка. По обеим сторонам от зародыша располагается внезародышевая часть *area pellucida* и *area opaca*, куда продолжают все три зародышевых листка. Ближайшая к зародышу часть *area opaca* представляет область желточного мешка. Более удаленная ее часть — участок зародышевого вала.

На поперечном срезе на уровне хвостового отдела (рис. 85, в) можно видеть, что нервные валики еще более раздвинуты. Под нервной пластинкой видна хорда, по бокам от них располагаются осевая мезодерма. Внезародышевые части имеют то же строение, что и на предыдущих срезах, но здесь мы видим в стенке желточного мешка островки кроветворения.

Стадии развития сердца (поперечные срезы). Закладка сердца наблюдается на стадии 3—5 пар сомитов, приблизительно на 26—30 ч инкубации. На рис. 86 представлены начальные стадии образования сердца. Первоначально это парный зачаток небольшой протяженности, расположенный на уровне заднего отдела зародыша в виде утолщений спланхноплевры (рис. 86, а), представляющих собой закладку эпимиокарда. За счет выселяющихся клеток последнего возникает эндокард в виде тонкой пленки эндотелиальных клеток, из которых формируются две тонкостенные трубки по бокам передних кишечных отверстий. На рис. 86, б изображен поперечный срез зародыша на стадии 7 пар сомитов, где представлена картина дальнейшего развития зачатков сердца. В результате смыкания боковых туловищных складок, приводящего к замыканию начального (глоточного) отдела передней кишки, правая и левая эндокардиальные трубки приходят в непосредственный контакт с нижней стенкой глотки, эпимиокард образует единую трубку вокруг эндокарда, подвешенную на вентральном и дорсальном мезентериях сердца. Позднее (рис. 86, в) на стадии 10 пар сомитов, эндокардиальные трубки, сближаясь, сливаются в единую трубку путем редукции их общей стенки. Эпикард является также внутренней выстилкой околосердечной сумки, наружная стенка которой (перикард) образуется позднее за счет париетального листка мезодермы.

Стадия трех мозговых пузырей на тотальном препарате (30—49 ч инкубации). У зародыша на этой стадии (рис. 87) хорошо различимы передний, средний и задний мозговые пузыри, четко отграниченные друг от друга перетяжками, и глазные пузыри. Передняя половина заднего мозга имеет пять подразделений (нейромеров), являющихся, по-видимому, временными образованиями. Нервная трубка замкнута на всем протяжении

сегментированного участка тела, за последним сомитом нервные складки еще не сомкнуты. Зародыш имеет от 13 до 19 пар сомитов. Сердечная трубка изогнута вправо, к ней подходят желточные вены. На заднем конце бластодиска кровяные островки в области *area vasculosa* распространяются в область *area pellucida*.

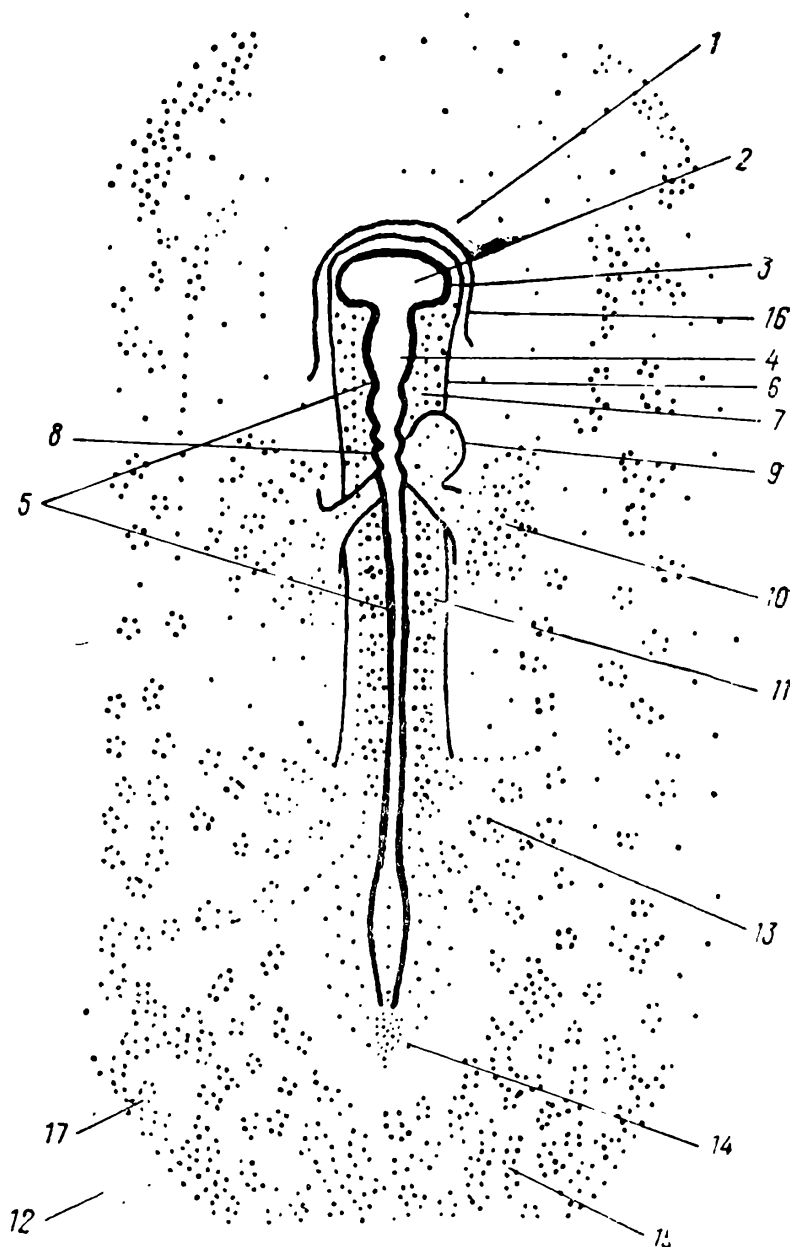


Рис. 87. Зародыш курицы на стадии 3 мозговых пузырей [Hamburger, Hamilton, 1951].

1 — проамнион, 2 — передний мозговой пузырь, 3 — глазной пузырь, 4, 5 — средний и задний (5) мозговые пузыри. 6 — стенка тела, 7 — передняя кишка, 8 — нейромера, 9 — сердце, 10 — желточные вены, 11 — сомит, 12 — *area vitellina*, 13 — желточно-белковая артерия, 14 — первичная полоска, 15 — кровяные островки, 16 — головная складка амниона, 17 —

Стадия поворота зародыша на левый бок на тотальном препарате (50—53 ч инкубации). Характерной особенностью следующих этапов развития зародыша является его поворот на

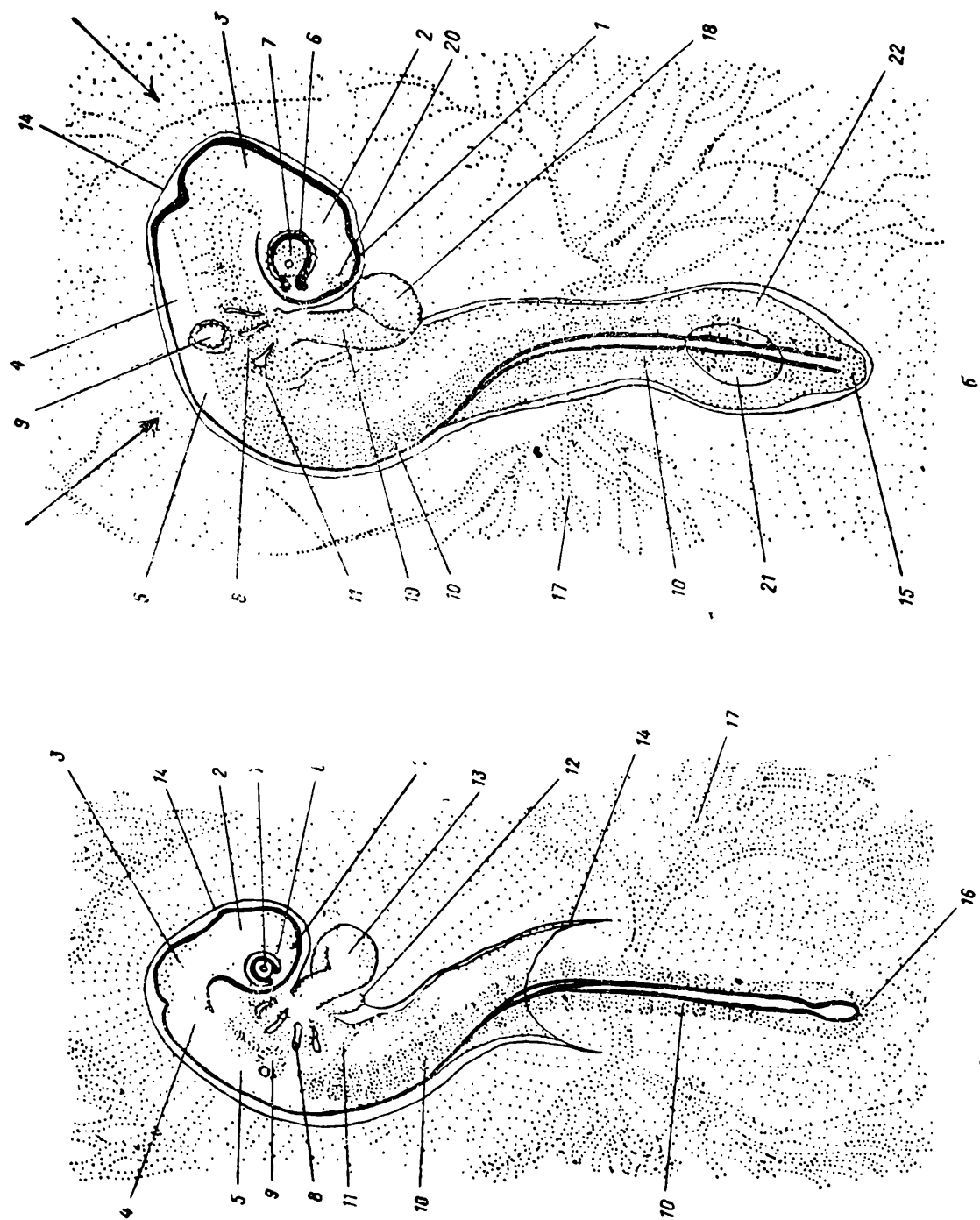


Рис. 88. Зародыш курицы на стадии поворота на левый бок [Hamilton, 1952].

а, б — начало (а) и завершение (б) поворота; 1—5 — мозг (1 — передний, 2 — промежуточный, 3 — средний, 4 — задний, 5 — продолговатый), 6 — глазной бокал, 7 — хрусталик глаза, 8 — жаберные щели, 9 — слуховой пузырек, 10 — сомит, 11 — кювьеров проток, 12 — атриум, 13 — желудочек сердца, 14 — амнион, 15 — хвостовая почка, 16 — хвостовая складка, 17 — желточно-брыжеечные артерии, 18 — сердце, 19 — артериальная луковица, 20 — обонятельная ямка, 21 — отверстие амниона, 22 — почки задних конечностей. Стрелками показаны изгибы мозговой трубки.

левый бок, который осуществляется в период приблизительно от 45 до 72 ч инкубации. Этот процесс происходит постепенно, начинаясь на головном конце, поэтому (как видно на рис. 88, а, демонстрирующем зародыша 50—53 ч инкубации) передняя часть тела зародыша уже лежит на желтке левым боком, а задняя часть еще распластана на нем. Различимы уже пять мозговых пузырей: первичный передний мозг подразделяется на вторичный передний мозг (telencephalon) и промежуточный (diencephalon), с передней частью которого связаны глазные пузыри, преобразующиеся к этому времени в глазные бокалы. Средний мозг (mesencephalon) остается не разделенным, а задний пузырь делится на задний (metencephalon) и продолговатый (myelencephalon) мозг. Мозговая трубка изогнута в области среднего мозга. К этому моменту значительно продвинулось и развитие глаз (см. схему на рис. 89). Глазные пузыри, возник-

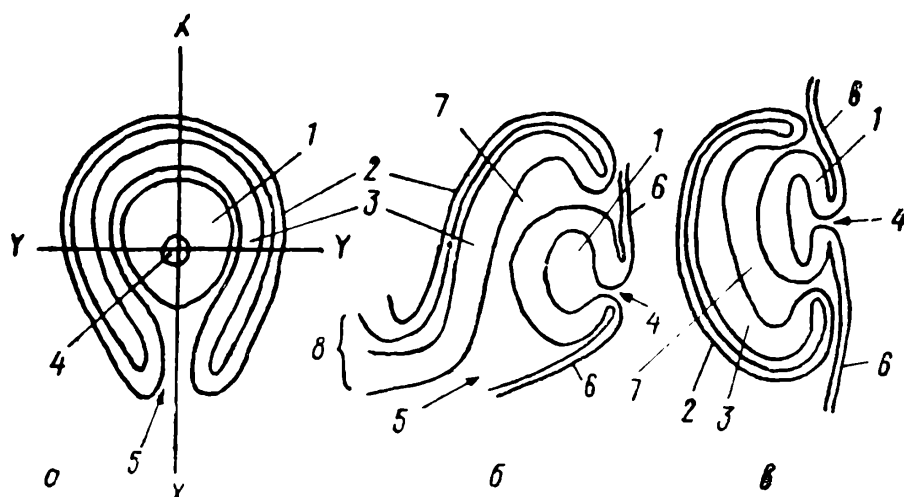


Рис. 89. Полусхематическое изображение строения глаза эмбриона курицы на стадии 27—30 пар сомитов [Hamilton, 1952].

а — вид сбоку, б — разрез в плоскости X—X, в — разрез в плоскости Y—Y; 1 — хрусталик глаза, 2 — боковая стенка промежуточного мозга, 3 — внутренний слой глазной чаши, 4 — отверстие хрусталикового мешочка, 5 — хороидальная щель, 6 — зародышевая эктодерма, 7 — задняя камера глаза, 8 — ножка глазного бокала.

кающие в виде боковых вздутий первичного переднего мозга на стадии 9—10 сомитов, сначала широко открыты в полость переднего мозга. Позднее в результате образования вентрально направленных складок эти соединения превращаются в узкие трубчатые глазные стебельки, которые затем преобразуются в зрительные нервы. В результате подразделения первичного переднего мозга на telencephalon и diencephalon, глазные стебельки оказываются соединенными с последним. На стадии 17—18 сомитов наружная стенка глазного пузыря утолщается и постепенно впячивается, эта инвагинация приводит ее в контакт с внутренней стенкой. Так образуется глазная чаша. Отверстие чаши, обращенное наружу и вниз, продолжается в виде хороидальной щели на вентральную сторону стебелька. От-

верстие чаши становится зрачком, а нижняя хороидальная щель впоследствии замыкается. Одновременно с утолщением наружной стенки глазного пузыря утолщается эктодерма над ним и образуется хрусталиковая плакода. Затем происходит инвагинация этого материала, ведущая к образованию толсто-стенной ямки, которая вскоре замыкается, образуя мешочек — зачаток хрусталика (линзы). На тотальном препарате (рис. 88, а) хорошо виден зачаток глаза со стороны зрачка с хрусталиком. Двуслойный контур стенки глазного бокала разомкнут хороидальной щелью.

В области заднего мозга можно видеть слуховые пузырьки (отоцисты) — зачатки внутреннего уха, или лабиринта, который объединяет орган слуха и равновесия. Развиваются слуховые пузырьки из материала слуховых плакод, формирующихся на стадии 12 пар сомитов в виде утолщений эктодермы, расположенных на дорсальной стороне головы на уровне последнего нейромера заднего мозга. На стадии 16 пар сомитов плакоды преобразуются в широко открытые ямки, на стадии 20 пар сомитов их отверстия сужаются и постепенно замыкаются к стадии 28—30 пар сомитов, образуя слуховые пузырьки. На одном уровне с последними на препарате видны три жаберные щели. Поскольку зародыш лежит на левом боку, мы видим только жаберные щели правой стороны. За счет первой пары жаберных щелей образуется среднее ухо.

Тело зародыша на этой стадии почти полностью сегментировано и насчитывает 26—28 пар сомитов, на заднем конце тела остается малодифференцированный материал хвостовой почки. Сердце на этой стадии петлеобразно изогнуто. Кровь из сердца поступает через брюшную аорту, через дуги аорты, по спинным аортам, а затем через желточные артерии во внезародышевую сосудистую сеть, оттуда кровь, обогащенная питательными веществами и кислородом, по желточным венам через венозный проток возвращается в сердце. Большая часть тела зародыша одета амнионом, с развитием которого удобнее познакомиться по срезам.

На рис. 88, б видно, что поворот зародыша на левый бок на этой стадии доходит до уровня закладок ног, которые в виде боковых выступов видны в задней части туловища. Число сомитов достигает 34—40 пар, кончик хвоста еще не сегментирован. Мозговая трубка образует теменной и затылочный изгибы, в результате чего головной отдел зародыша еще более изогнут, чем на предыдущей стадии, так что передний конец головы оказывается на уровне сердца и оси переднего и заднего мозга образуют острый угол, а шейный изгиб — широкую дугу. Хорошо видны 3 правые жаберные щели, 4-я слабо различима или отсутствует вовсе. Перетяжки между отделами мозга стали глубже. В передней части головы на уровне telencephalon видны обонятельные ямки — результат погружения материала обоня-

тельных плакод. На дорсальной стенке промежуточного мозга имеется выступ, из которого в дальнейшем образуется эпифиз. Хорошо виден слуховой пузырек. Начинается пигментация глаз. Сердечная трубка быстро растет и в связи с тем, что передний и задний ее концы связаны с сосудами (брюшной аортой и желточно-брыжеечными венами), неприкрепленная средняя желудочковая часть сердца делает сначала U-образный изгиб, а затем скручивается петлей. В результате область предсердия передвигается налево и вперед, т. е. занимает такое же положение, как и у взрослых птиц, а артериальная луковица ложится накрест с предсердием, направо ближе к спине.

На стадии 3 сут инкубации происходит замыкание амниотических складок. На рассматриваемом препарате этот процесс еще не закончился и видно овальное отверстие амниона.

Стадия образования амниона (52—64 ч инкубации, поперечные срезы). Амнион возникает в виде приподнимающихся складок в прилежащей к зародышу части внезародышевой эктодермы и подстилающего ее париетального листка мезодермы. Сначала на стадии 12—15 пар сомитов (40—45 ч инкубации), когда голова зародыша в результате изгиба мозговой трубки несколько погружена в желток, появляется складка впереди зародыша (головная складка амниона), которая растет назад над головой зародыша, одевая ее в виде капюшона, боковые стороны последнего вытягиваются, образуя боковые складки, растущие назад и навстречу друг другу, и постепенно сливаются в направлении к заднему концу тела, где на стадии 27 пар сомитов образуется хвостовая складка амниона. Процесс слияния амниотических складок продолжается до стадии 31—34 пар сомитов (3 дня инкубации).

На поперечном срезе, который проходит приблизительно на уровне 20-й пары сомитов (рис. 90, *a*) виден осевой комплекс зачатков. На дорсальной стороне среза расположена нервная трубка, боковые стенки которой утолщены, а дорсальная и вентральная — тонкие, в результате чего просвет приобретает щелевидную форму. Под нервной трубкой располагается хорда, а еще ниже — парная дорсальная аорта. По бокам от нервной трубки и хорды лежат сомиты. К этому времени уже все сомиты дифференцированы на три участка: дорсо-латеральный — дерматом (зачаток соединительной ткани кожи), медио-вентральный — склеротом (скелетогенная мезенхима), и расположенный между ними миотом (зачаток скелетной мускулатуры). Дерматом и миотом имеют вид эпителиоподобных пластов, состоящих из высоких клеток, тогда как склеротом представляет собой рыхлый зачаток, он сильно развит у птиц и заполняет пространство между миотомом, нервной трубкой и хордой. Нефротомы, прилегающие к сомитам, уже дифференцированы на почечные канальцы и выводной проток (вольфов канал) головной и первичной почек, который лежит в вентро-латеральной

части тела зародыша. Париетальный и висцеральный листки спланхнотомы ограничивают зародышевый целом и лежащую за пределами зародыша часть целома, получившую название экзодель. Кишка на этом уровне не замкнута. По бокам тела зародыша приподняты амниотические складки.

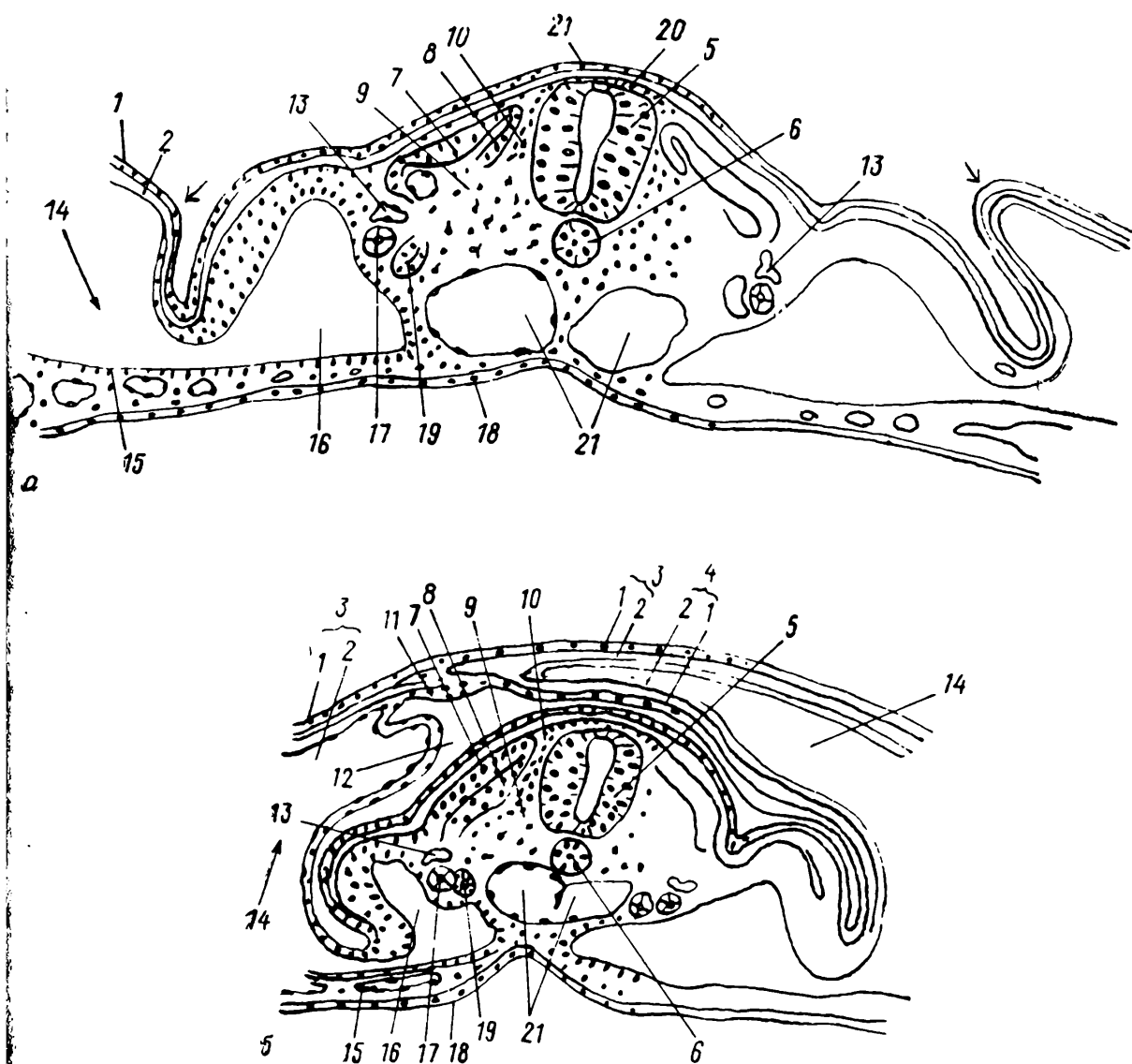


Рис. 90. Зародыш курицы на разных этапах образования амниона [Hamilton, 1952].

а, б — поперечные срезы на уровне 20-й пары (а) и 17-й пары (б) сомитов. Стрелками отмечены амниотические складки. 1 — внезародышевая эктодерма, 2 — париетальный листок спланхнотомы, 3 — сероза (хорион), 4 — амнион, 5 — нервная трубка, 6 — хорда, 7 — дерматом, 8 — миотом, 9 — склеротом, 10 — спинальный ганглий, 11 — серозо-амниотическая связь, 12 — амниотическая полость, 13 — задние кардинальные вены, 14 — экзодель, 15 — висцеральный листок спланхнотомы, 16 — целом, 17 — вольфов канал, 18 — зародышевая (кишечная) энтодерма, 19 — каналец мезонефроса, 20 — нейральный гребень, 21 — дорсальная аорта.

На более краниальном срезе того же зародыша, проходящем на уровне приблизительно 17-й пары сомитов (рис. 90, б), видно, что над зародышем произошло смыкание амниотических складок, в результате которого образовались две зародышевые оболочки: наружная сероза (или хорион) и внутренняя — амни-

он. Наружный слой серозы представлен внезародышевой эктодермой, а внутренний — париетальным листком мезодермы, который образует также наружный слой стенки амниона, тогда как внутренний его слой эктодермальный; таким образом, полость, возникшая при смыкании амниотических складок, представляет собой экзоцель.

Серозная оболочка помимо уже упомянутой дыхательной выполняет еще трофическую функцию. По мере развития сероза плотно срастается с возникающим позднее аллантоисом, образуя, как уже говорилось, хорио-аллантоис, который разрастается по внутренней стороне скорлупы яйца, оттесняя белок к острому концу яйца. При дальнейшем разрастании серозы и аллантоиса внутренняя стенка последнего своим мезодермальным слоем срастается с мезодермальным слоем серозы и окружает загустевшую белковую массу, формируя белковый мешок. Стенка белкового мешка образует ворсинки, увеличивающие ее поверхность. Ворсинки вдаются в белок и участвуют в его резорбции. Белковый мешок соединен с амнионом серозо-амниотическим каналом. С 10-го дня инкубации по этому каналу белок начинает поступать в амнион, откуда зародыш его заглатывает, переходя к внутрикишечному способу питания.

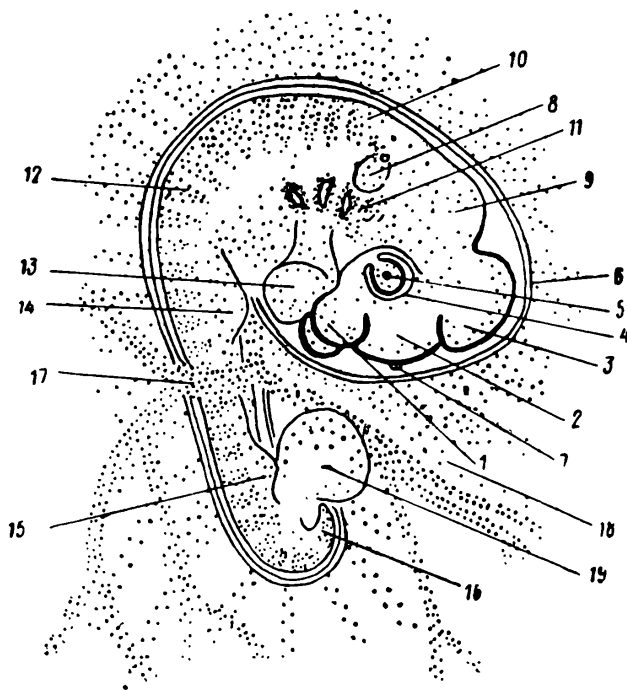


Рис. 91. Зародыш курицы на стадии 4 сут. инкубации [Hamilton, 1952].

1 — передний мозг, 2 — промежуточный мозг, 3 — средний мозг, 4 — глазной бокал, 5 — хрусталик, 6 — амнион, 7 — эпифиз, 8 — слуховой пузырек, 9 — задний мозг, 10 — продолговатый мозг, 11 — жаберные щели, 12 — сомиты, 13 — сердце, 14 — почка крыла, 15 — почка задних конечностей, 16 — хвостовая почка, 17 — желточно-брыжеечные вены, 18 — желточная артерия, 19 — аллантоис.

Стадия 4 сут инкубации (тотальный препарат).

Характеристика зародыша на этой стадии развития частично дана в разделе прижизненных наблюдений. К этому времени заканчивается сегментация осевой мезодермы зародыша, завершается его поворот на левый бок (рис. 91). Спинная сторона тела изогнута. Амнион плотно облегает зародыш. На препарате хорошо виден аллантоис в виде небольшого пузырька, выступающего в задней части зародыша. Аллантоис образуется на третьей сутки инкубации в виде небольшого выпячивания вентральной стенки заднего отдела кишки зародыша в области клоаки, наружная поверхность которого покры-

та слоем висцеральной мезодермы. Позднее наружная стенка аллантоиса, срастаясь с серозой, образует хорио-аллантоис, который с 8-х суток инкубации служит органом дыхания на протяжении остального периода развития. Стенка хорио-аллантоиса состоит из наружного эктодермального слоя серозы, под которым располагается густая капиллярная сеть, обеспечивающая газообмен, толстого слоя мезенхимы, образованного за счет мезодермальных слоев серозы и аллантоиса, и эпителия аллантоиса. Стенка аллантоиса, обращенная к амниону и желточному мешку, гораздо тоньше и состоит из внутреннего эпителиального слоя и наружного, образованного висцеральной мезодермой. Сосудистая сеть аллантоиса на рассматриваемой стадии еще слабо развита.

На препарате видна сеть кровеносных сосудов желточного мешка, формирующаяся в висцеральном листке мезодермы, который вместе с желточной энтодермой образует стенку желточного мешка. К 3-м суткам инкубации сосудистое поле желточного мешка имеет 2,5 см в диаметре, к 6-м суткам достигает экватора яйца и выстилает всю внутреннюю стенку воздушной камеры, благодаря чему выполняет функцию дыхания. Позднее, когда разрастается аллантоис и отделяет сосуды желточного мешка от подскорлуповой оболочки, желточный мешок перестает участвовать в газообмене зародыша. Желточный мешок постепенно разрастается по поверхности желтка, становясь его резервуаром, и выполняет трофическую функцию. В ходе дальнейшего развития зародыша всасывательная поверхность желточного мешка увеличивается вследствие образования складок желточной энтодермы вокруг крупных кровеносных сосудов желточного мешка и погружения их в толщу желтка. По мере потребления желтка в ходе инкубации размеры желточного мешка постепенно уменьшаются.

Дальнейшее развитие характеризуется интенсивными процессами органогенеза. После 14-го дня инкубации наступает период более быстрого роста дефинитивных органов зародыша и начала их функционирования. Зародыш активно заглатывает и переваривает белок, начинает функционировать вторичная печень и т. д. Форма тела продолжает изменяться, приближаясь к характерной для взрослой птицы, увеличиваются размеры тела. К концу развития зародышевые оболочки утрачивают свое значение и при вылуплении цыпленка остаются в скорлупе. Желточный мешок с остатками желтка втягивается в брюшную полость цыпленка. Курица относится к выводковым птицам, поэтому из яйца выходит полностью сформированный цыпленок, способный к самостоятельной жизни.

МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

Среди млекопитающих группа плацентарных (п/кл Eutheria) занимает самое высокое в эволюционном отношении положение. В этой группе животных зародыши на довольно ранних стадиях эмбриогенеза имплантируются в стенку матки материнского организма. Дальнейшее развитие зародышей обеспечивается питательными веществами, поступающими к ним от матери через временный многофункциональный орган — плаценту. Она одновременно включает в себя как ткани материнского организма, так и зародыша. Через плаценту происходит питание зародыша, газообмен, выведение конечных продуктов обмена и токсичных веществ, она защищает плод от инфекции, в клетках ее тканей происходит синтез ферментов и гормонов.

В связи с развитием плаценты яйца млекопитающих утратили резервные питательные материалы, которыми обладали яйцеклетки их предков — рептилий. Однако в развитии млекопитающих сохранилось немало особенностей, характерных для эмбриогенеза рептилий и птиц.

Особенности биологии млекопитающих долгое время делали их труднодоступными для экспериментально-эмбриологических исследований. Однако за последние десятилетия разработаны методы культивирования зародышей мышей и крыс вне материнского организма в течение некоторого времени.

Чтобы иметь возможность сравнивать зародышей различных млекопитающих между собой, были созданы таблицы эквивалентных (соответствующих) стадий их развития. Эмбриогенез мыши, как наиболее изученный, был разделен на 24 стадии, каждая из которых характеризуется определенными морфологическими признаками. Эмбриогенез других млекопитающих, в том числе и человека, также можно рассматривать по стадиям, учитывая разработанный комплекс морфологических критериев. Однако нужно иметь в виду, что зародыши одной стадии раз-

вития, но принадлежащие разным видам, не всегда точно совпадают по всем морфологическим признакам.*

Предлагаемые для практикума методические приемы не очень трудоемки и для их выполнения требуется набор самых простых реактивов и инструментов. С ранними доимплантационными стадиями развития удобно познакомиться по прижизненным или тотальным препаратам, с более поздними — преимущественно по срезам.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обычными объектами в эмбриологической практике служат представители грызунов: мыши, крысы, хомяки и кролики, которых легко разводить и содержать в лабораторных условиях. Среди них мыши и крысы используются наиболее часто. Животных одного пола содержат группами в специальных клетках. Для экспериментальной работы немаловажно, чтобы условия их содержания (температура, влажность, световой режим, диета) были одинаковы. В настоящее время все чаще в исследованиях используются не беспородные белые мыши и крысы (альбиносы домашней мыши *Mus musculus* и серой крысы-пасюка — *Rattus norvegicus*), а так называемые линейные. Для получения зародышей используются мыши в возрасте от 4—5 недель, а крысы от 8—9 недель и старше. Как мыши, так и крысы — высокоплодовитые животные. В среднем у мышей в одном помете бывает 6—9, а у крыс до 12 детенышей. Беременность длится у мышей и крыс соответственно 19 и 21 сут. Время наступления полового созревания, продолжительность беременности, плодовитость, темпы эмбрионального развития и некоторые другие показатели неодинаковы у различных линий животных. Поэтому необходимо оговориться, что все приводимые здесь данные относятся к беспородным белым мышам и крысам.

Мыши и крысы, как и другие грызуны — полиэстральные животные, т. е. осуществляют репродуктивную функцию круглогодично, в отличие от моноэстральных, у которых размножение сезонное. У полиэстральных животных созревание яйцеклеток и их овуляция происходят циклично. Все фазы роста фолликулов и овуляция яйцеклеток сопровождаются изменениями в тканях матки, подготавливающими ее к имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Если оплодотворение не произойдет, внутренние слои матки подвергаются деструкции (обратному развитию). Все изменения в яичнике и матке регулируются го-

* В данном разделе рассматриваются некоторые стадии развития мыши или крысы по работам [Snell, Stevens, 1966], [Rugh, 1968] и [Edwards, 1968]. На русском языке эти вопросы изложены в книгах: «Объекты биологии развития» и «Методы биологии развития».

надотропными гормонами, выделяемыми передней долей гипофиза. Весь комплекс описываемых регулярных изменений в половых путях самки называется репродуктивным, а у грызунов эстральным циклом. Продолжительность одного эстрального цикла у мышей и крыс — 4—5 сут.

В эстральном цикле самки крысы или мыши различают несколько стадий: эструс (течка), метаэструс, диэструс, проэструс. Научиться распознавать стадии эстрального цикла достаточно легко. Для этого пипеткой с водой или тонкой палочкой с плотным ватным тампоном на конце берут вагинальные мазки и наносят их на слегка смоченное водой предметное стекло. Если рассматривать мазки тотчас, то под малым увеличением микроскопа хорошо видны клеточные элементы, по которым можно определить стадию эстрального цикла.

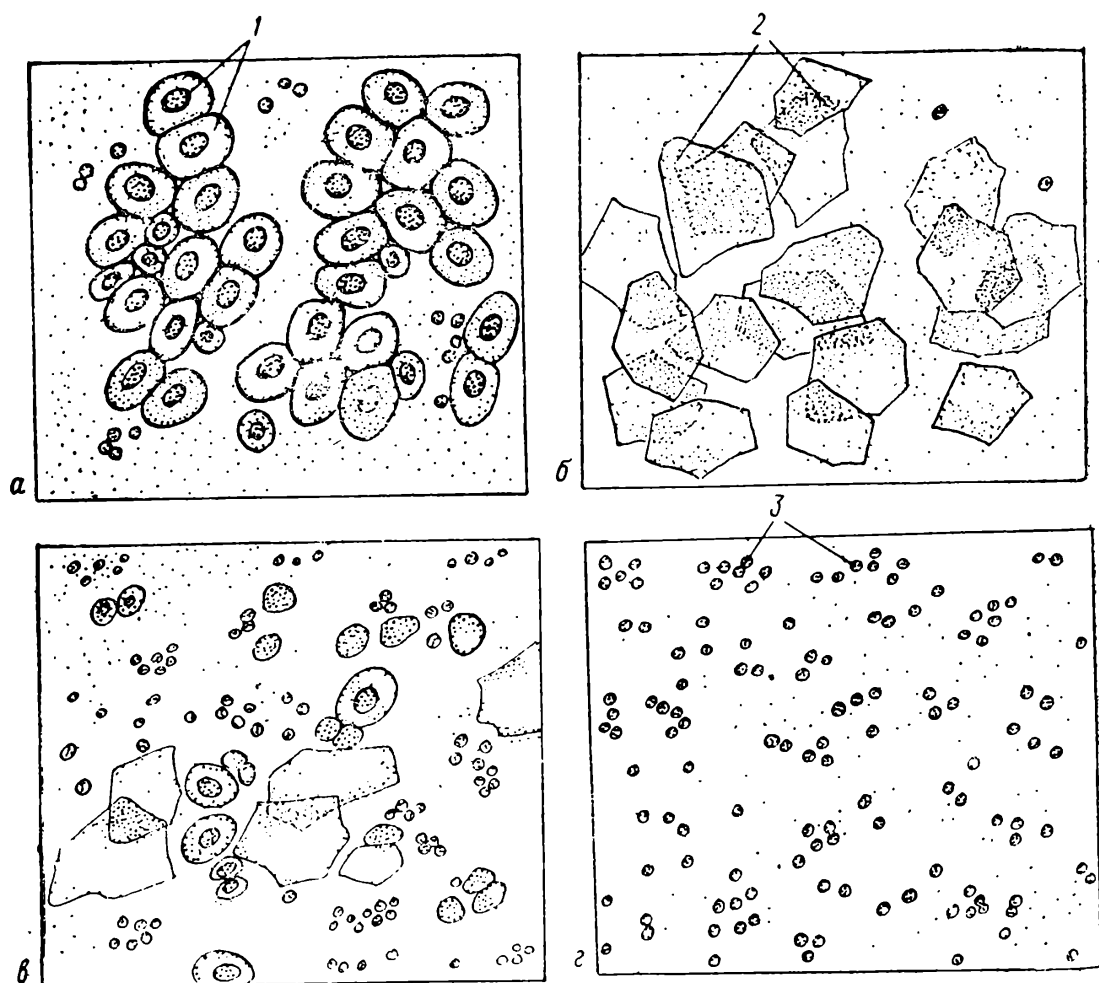


Рис. 92. Стадии эстрального цикла у крысы.

а — проэструс, б — эструс, в — метаэструс, г — диэструс; 1 — эпителиальные клетки, 2 — ороговевшие эпителиальные клетки, 3 — лейкоциты.

В период проэструса вагинальный мазок изобилует овальными ядерными клетками эпителия (рис. 92, а).

Во время эструса все поле зрения заполнено ороговевшими чешуйчатыми клетками эпителия. Отдельные чешуйки сли-

паются в комки, которые хорошо видны на предметном стекле новооруженным глазом (рис. 92, б).

В период метаэструса I и II в мазках встречаются 3 типа клеточных элементов: овальные эпителиальные клетки с ядрами, ороговевающие безъядерные чешуйки и лейкоциты — мелкие круглые тельца. В течение этого периода соотношение клеток этих трех типов меняется. В начале метаэструса преобладают чешуйки, а в конце — лейкоциты (рис. 92, в).

На стадии диэструса мазок слизистый, в поле зрения огромное число лейкоцитов, а другие клеточные элементы не встречаются (рис. 92, г).

Овуляция у самок происходит на стадии эструса и только в этот период возможно спаривание. Поскольку момент овуляции приходится примерно на середину темного периода суток, спаривание обычно происходит ночью.

Для получения животных с точно датированным сроком беременности отбирают самок в стадии проэструса или раннего эструса и подсаживают на ночь в клетки к самцам. Для того чтобы убедиться, что спаривание произошло, утром следующего дня исследуют вагинальные мазки самок крыс — день появления спермиев в вагинальном мазке считается первым днем беременности.

У мышей наступление беременности установить проще, поскольку после спаривания влагалищное отверстие самки закрывается сгустком секрета белого цвета — копуляционной пробкой, которая хорошо заметна в течение 16—24 ч после спаривания.

Чтобы получить зародышей, приходится умерщвлять беременную самку. Для этого ее предварительно усыпляют эфиром и кладут на брюхо, а затем резким растягивающим движением смещают шейные позвонки. Животное переворачивают на спину и большими прямыми ножницами с помощью хирургического пинцета вскрывают брюшную стенку от низа живота до грудной клетки. Половая система располагается ближе к спинной стороне, под кишечником. Она представлена парными яичниками и яйцеводами, двурогой маткой и влагалищем (рис. 93). Для того чтобы отпрепарировать репродуктивный тракт целиком, нужно ножницами и хирургическим пинцетом постепенно отделять его от жировой ткани и мезентерия, связывающего тракт с остальными внутренними органами, начиная от яичника одной стороны вниз, и затем, перерезав влагалище, по другой стороне вверх. Район прикрепления матки к мезометрию называют ее мезометральной стороной, а противоположный — антимезометральной. Плаценты зародышей образуются на мезометральной стороне матки.

Неоплодотворенные яйцеклетки вскоре после овуляции можно получить сравнительно легко от самок, находящихся на стадии эструса. Для этого отпрепарированный яйцевод, который

имеет вид довольно плотно свернутой в клубочек изогнутой трубочки, нужно поместить в часовое стекло с небольшим количеством физиологического раствора. В начале своего пути по яйцеводу яйцеклетки обладают повышенной адгезивностью и образуют комок, видимый снаружи, как утолщение одной из

петель яйцевода. Под контролем бинокулярной лупы нужно найти это утолщение и разорвать его препаровальными иглами.

Оплодотворенные яйцеклетки и дробящиеся зародыши получают, промывая яйцеводы. Для этого их отделяют от матки и жировой ткани, помещают в часовое стекло или солонку. Под контролем бинокулярной лупы (об. $\times 2$) одной рукой вводят иглу шприца с небольшим (около 1 см³) объемом физиологического раствора в ампулу (воронку) яйцевода и, придерживая иглу в таком положении маленьким пинцетом, находящимся в другой руке, пропускают раствор через яйцевод. Удобно пользоваться готовыми растворами, например, выпускаемыми отечественной промышленностью средой 199 или раствором Хенкса. Для кратковременных наблюдений можно использовать 0,9%-ный раствор NaCl.

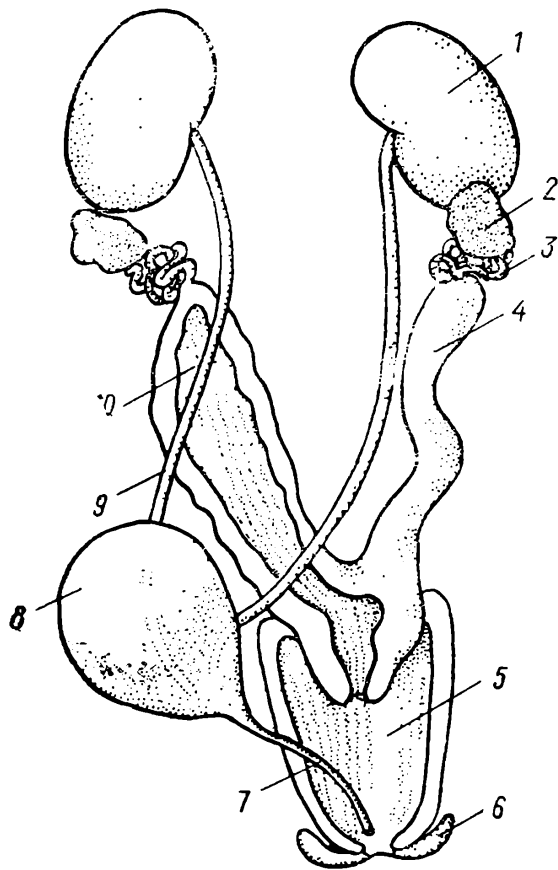


Рис. 93. Строение репродуктивного тракта мыши. Правый рог матки вскрыт [Rugh, 1968].

1 — почка, 2 — яичник, 3 — яйцевод, 4 — рог матки, 5 — влагалище, 6 — клиторная железа, 7 — мочеспускательный канал, 8 — мочево́й пузырь, 9 — мочеточник, 10 — просвет матки.

Зародыши, вымытые физиологическим раствором из яйцевода, быстро оседают на дно. Для дальнейшей работы их переносят микропипеткой с резиновой трубкой в другое часовое стекло с небольшим количеством раствора. Держа свободный конец трубки во рту, засасывают зародышей в микропипетку и таким образом переносят из одного стекла в другое.

Для этих манипуляций используют тонкую инъекционную иглу и шприц объемом 1—2 мл; иглу нужно специально заточить: сначала стачивается на бруске скошенный край, а затем, чтобы уменьшить ее диаметр, равномерно по всей окружности обтачивается конец иглы.

Для прижизненных наблюдений яйцеклетки или зародыши помещают на предметное стекло в каплю физиологического раствора. Чтобы не раздавить объект, под покрывное стекло подкладывают осколки стекла или волосы, удобно пользоваться также пластилином. Зародышей можно сохранять живыми в таком препарате до 0,5 ч даже при комнатной температуре, но предохраняя от высыхания. Второе условие наиболее важное, поскольку зародыши очень чувствительны к изменению осмотического давления и величины РН среды. У погибающих зародышей начинается фрагментация — деструктивный процесс. При этом деление бластомеров на отдельные неравномерные части не сопровождается митозом. При отсутствии навыка работы с ранними зародышами можно ошибочно принять фрагментацию за дробление (см. рис. 94, а—ж, сравни с рис. 94, з). Наилучший способ сохранить зародышей — поместить их на предметное стекло в лунку с капелькой физиологического раствора, поверх которого наливается тонкий слой вазелинового масла.*

Для прижизненных наблюдений дробящихся зародышей, извлеченных из половых путей самки, обычно используют фазово-контрастное устройство светового микроскопа. Для фазово-контрастного микроскопирования можно зафиксировать яйцеклетки в течение 15—60 мин смесью ледяной уксусной кислоты с этанолом в отношении 1 : 3.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Из яйцеклеток, вымытых из яйцеводов или матки, можно получить постоянные тотальные препараты, на которых тонкая структура выявляется лучше, чем на прижизненных. Проводку материала удобно производить в часовых стеклах и солонках. Для того чтобы сохранить как можно больше зародышей, нужно переносить их микропипеткой, снабженной гибкой трубкой из раствора в раствор, а не заменять растворы в одной и той же посуде.

Прежде чем приступить к изготовлению препаратов, следует научиться переносить зародышей, не теряя их. Для этой цели можно посоветовать выполнять следующие требования. Во-первых, прежде, чем засасывать зародыш, набирать в кончик пипетки небольшой объем раствора, во-вторых, пользоваться очень небольшими объемами растворов (1—2 см³) и, наконец, очень важно, чтобы микропипетки были изготовлены из тщательно вымытых трубочек (в противном случае зародыши прилипают к их стенкам). Диаметр открытого конца пипетки не должен заметно превышать диаметр зародышей, а длина ее капиллярной части не должна быть менее 40 мм.

* Эти и другие рекомендации по работе с живыми зародышами описаны в работах Бринстера [Brinster, 1969] и А. П. Дыбана [1974].

Зародышей фиксируют смесью насыщенного водного раствора сулемы, нейтрального формалина и дистиллированной воды. Объект переносят на предметное стекло в маленькую (с булавочную головку) каплю раствора куриного белка. Для его приготовления нужно смешать 3 части отфильтрованного свежего куриного белка с одной частью дистиллированной воды. С целью сохранения раствора для повторного использования в смесь добавляется кристаллик тимола. Дальнейший успех во многом зависит от того, насколько мало удастся привести воды в капельку белка при переносе зародыша. Всю дальнейшую проводку зародыш проходит в капельке коагулированного белка на предметном стекле. Для этого предметное стекло с каплей белка, содержащей зародыш, переворачивают и держат над парами спирта до тех пор, пока белок не побелеет. Прежде чем окрасить зародыш, устраняют следы сулемы. Для этого стекло погружают на 5—10 мин в смесь 50%-го спирта с раствором Люголя цвета крепкого чая. Затем переносят стекло в чистый 50%-ный спирт и держат в нем до просветления белковой капли около 10 мин. Отмывают препарат в дистиллированной воде 5 мин и окрашивают гематоксилином. Далее следует обычная проводка для заключения в бальзам.

От момента имплантации до стадий позднего органогенеза извлечь зародышей из матки без повреждений не удастся, поэтому эти стадии развития изучают на гистологических срезах.

Для фиксации и дальнейшей проводки зародышей 6—8-го дней развития матку разрезают поперек на отдельные кусочки с децидуальными утолщениями (плодовместилищами). У зародышей крысы 9—10-го дней развития наружные слои матки легко отделяются от децидуальной ткани, что дает возможность освободиться от них до начала фиксации. Это можно сделать с помощью двух маленьких хирургических пинцетов, предварительно разрезав беременную матку вышеуказанным способом. Зародыши, заключенные в децидуальную оболочку, имеют яйцевидную форму; тупой конец соответствует мезометральной, а заостренный — антимезометральной сторонам зародыша. Тело зародыша смещено к антимезометральному полюсу матки. Децидуальная оболочка матки по мере развития зародыша постепенно истончается и округляется так, что крысиный зародыш 12-го дня развития представляет собой уже правильную сферу. Размеры крысиных зародышей 9—12-го дней развития, заключенных в децидуальную оболочку, составляют соответственно 3,5 и 5 мм.

Децидуальную оболочку можно снять, разрезав ее продольно от тупого конца к острому при помощи микроскальпеля с хорошо заостренным концом. Рекомендуются сделать 2 продольных меридиональных разреза на противоположных сторонах. Для этого, держа скальпель лезвием кверху, острым концом прокалывают децидуальную оболочку на тупом конце зародыша.

затем прорезают ее лезвием скальпеля. При этом зародыш ридерживают Г-образно изогнутой препаровальной иглой. Затем одновременно двумя малыми хирургическими пинцетами осторожно снимают разрезанную на две половинки децидуальную оболочку.

Сквозь прозрачную стенку желточного мешка и примыкающую к нему снаружи тонкую бесклеточную Рейхертову мембрану виден зародыш, его пупочный канатик, амниотическая полость. У 12-дневного крысиного зародыша можно наблюдать циркуляцию крови по сети кровеносных сосудов желточного мешка и (в течение нескольких минут) сердечные сокращения.

Чтобы освободить зародыш, нужно осторожно разорвать пинцетами все перечисленные оболочки, включая амниотическую, окружающую непосредственно зародыш, и разрушить пупочный канатик.

Все описанные выше манипуляции проводят с каждым зародышем отдельно в маленькой чашке Петри с физиологическим раствором под контролем бинокулярной лупы.

Для фиксации подготовленного таким образом материала рекомендуются жидкости Буэна и Карнуа. Дальнейшую проводку можно осуществлять через хлороформ, но лучшие результаты дает проводка через бензол по следующей схеме: фиксация 30 мин; обезвоживание: 96%-ный спирт + бензол (1 ч); бензол I + бензол II (около 3 ч); бензол-парафин (40 мин); парафин I—парафин II (2 ч). Схема проводки через хлороформ: фиксация; обезвоживание: 96%-ный спирт (3 ч); изобутиловый спирт (2,5 ч); изобутиловый спирт + хлороформ (1 ч); хлороформ + парафин (1,5 ч); парафин I и парафин II (2,5 ч).

Изготавливают срезы толщиной от 5 до 8 мкм в зависимости от возраста зародышей. Для приготовления обзорных препаратов лучше использовать окраску гематоксилином Майера с докраской эозином или азановый метод по Гейденгайну. Хорошо выявляются структуры окружающих зародыш тканей матки после окраски по Маллори.

Зародышей старше 12 дней — для крысы, и 10 дней — для мыши, можно получить более простым путем. Матку с зародышами (каждый рог матки отдельно) закрепляют булавками в растянутом состоянии в кювете с восковым дном. Маленькими ножницами с заостренными концами разрезают матку вдоль по ее антимезометральной стороне, поскольку на мезометральной — располагаются плаценты зародышей. Затем двумя хирургическими пинцетами вскрывают оболочки и извлекают зародышей. Для изучения внешнего строения развивающихся зародышей исследуют прижизненно, поместив их в физиологический раствор. Однако на фиксированных жидкостью Буэна зародышах некоторые структуры выявляются более четко. В этом фиксаторе зародышей можно хранить сколь угодно долго.

ОПИСАНИЕ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ ПО ПРЕПАРАТАМ

Овулировавшее яйцо (тотальный препарат). Яйцеклетки мышей и крыс практически не содержат желтка и относятся к алецитальному типу, диаметр их около 100 мкм.

У крыс и мышей из обоих яичников овулирует до 20 яйце-

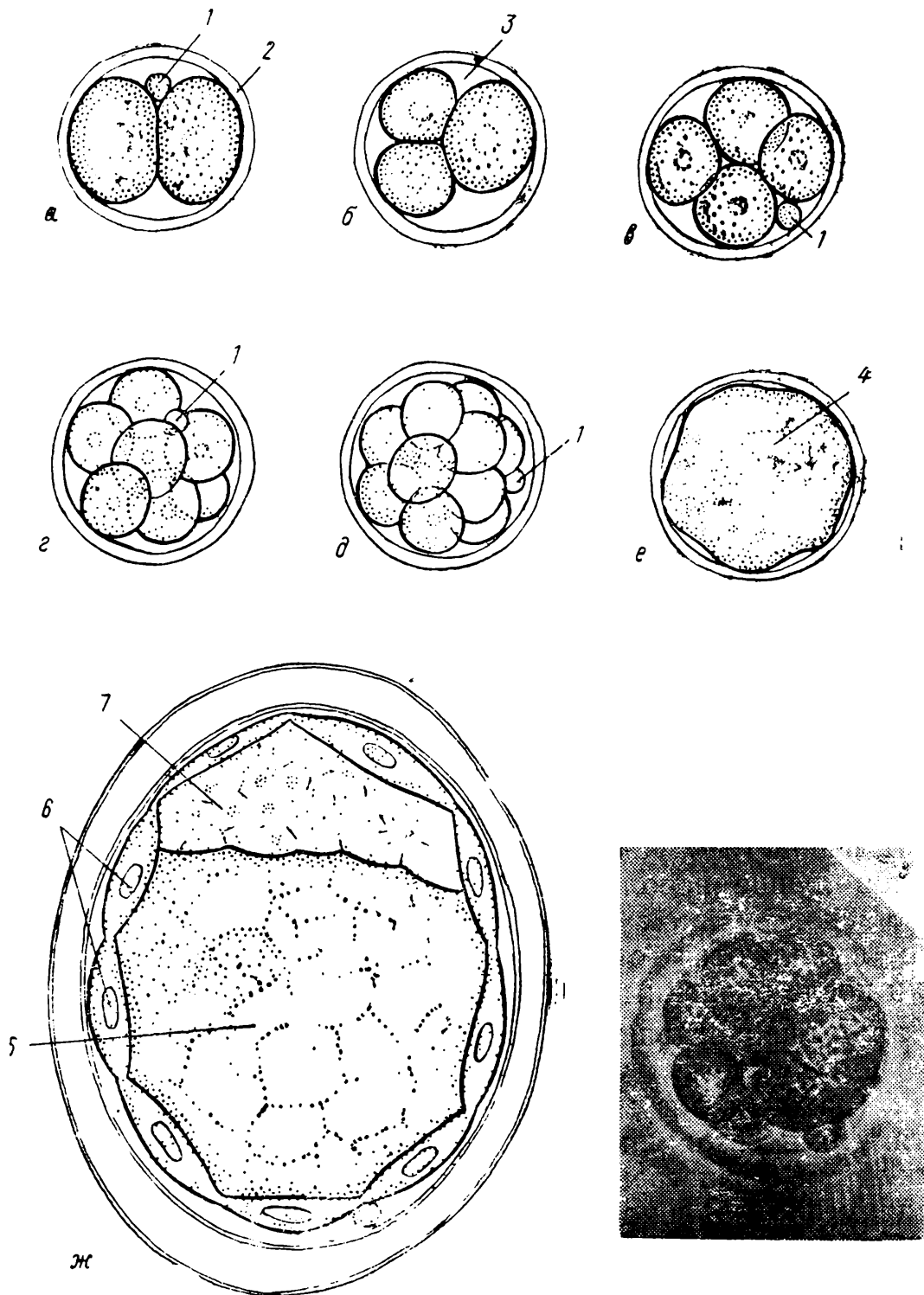


Рис. 94. Дробление зародыша мыши.

а — 2 бластомера, *б* — 3, *в* — 4, *г* — 8, *д* — 12 бластомеров, *е* — морула, *ж* — бластоциста, *з* — дегенерирующий зародыш (фото, фазовый контраст); *1* — 1-е полярное тельце, *2* — блестящая оболочка, *3* — перивителлиновое пространство, *4* — начало формирования blastocoel, *5* — blastocoel, *6* — трофоблеста, *7* — внутренняя клеточная масса (*ж* — увеличено).

клеток, находящихся на стадии метафазы 2-го деления созревания. После выхода из Граафовых пузырьков яйцеклетки попадают в брюшную полость, откуда они через воронку яйцевода, открытую в сторону яичника, попадают в яйцевод и направляются по нему в сторону матки. Яйцеклетка в этот момент окружена тонкой «блестящей» оболочкой (*zona pellucida*), которую мешает рассмотреть на живом материале наружная оболочка (*corona radiata*) или «лучистый венец», состоящий из многочисленных фолликулярных клеток. Блестящая оболочка неплотно прилегает к цитоплазматической мембране яйца и в образующееся пространство выделяется первое направительное вещество, а в дальнейшем, если произойдет оплодотворение, и второе.

Оплодотворение происходит обычно в верхней части яйцевода, в результате зигота теряет лучистый венец, цитоплазма ее несколько сжимается и между цитоплазматической мембраной яйцеклетки и блестящей оболочкой образуется перивителлиновое пространство.

Стадии дробления зародыша мыши (тотальный препарат). У мыши дробление зиготы начинается в яйцевode приблизительно через сутки после оплодотворения. Дробление — полное, равномерное и так как, начиная с двухклеточной стадии, отдельные бластомеры делятся с различной скоростью — асинхронное (рис. 94, а — д). Зародыши проходят стадии 3, 4, 5 и т. д. бластомеров и через трое суток достигают стадии морулы (рис. 94, е). У мыши зародыши покидают яйцевод и переходят в матку в течение третьих суток развития на стадии 8 бластомеров. Крысиные зародыши остаются в яйцевode в течение 4 суток до стадии морулы (16—32 бластомера). На стадии морулы границы отдельных клеток плохо различимы.

Бластоциста мыши (тотальный препарат). Среди компактной массы клеток морулы появляется и постепенно увеличивается эксцентрически расположенная полость — бластоцель, заполненная жидкостью, выделяемой бластомерами. С этого момента зародыш становится бластоцистой (рис. 94, ж). Бластоциста отличается от бластулы тем, что ее клетки уже дифференцированы на 2 типа. Стенка бластоцисты представлена трофобластом, состоящей из крупных вытянутых клеток; на одной стороне бластоцеля к ней примыкает группа клеток внутренней клеточной массы (ВКМ).^{*} В развитии провизорных структур участвует вся трофобласта и частично ВКМ, а клеточным источником формирования собственно зародыша служат только ВКМ.

Деление клеток в бластоцисте не прекращается, и поздняя бластоциста, в отличие от ранней, имеет правильную сфериче-

^{*} «Трофобласта» и «внутренняя клеточная масса» — термины более употребительные в современной научной литературе, чем «трофобласта» и «эмбриобласта».

скую форму, более крупные размеры. Поздняя бластоциста состоит из 120—200 бластомеров. В 1966 г. Тарковский предложил метод приготовления препаратов, позволяющий точно и довольно быстро определить число бластомеров и оценить состояние ядер отдельных бластомеров в зародышах доимплантационных стадий (подробнее о методе см. в книге «Методы биологии развития», с. 539).

Стадия зародышевого цилиндра (мышь—5,5—6 сут, крыса — 6—7 сут, продольный разрез зародыша крысы).

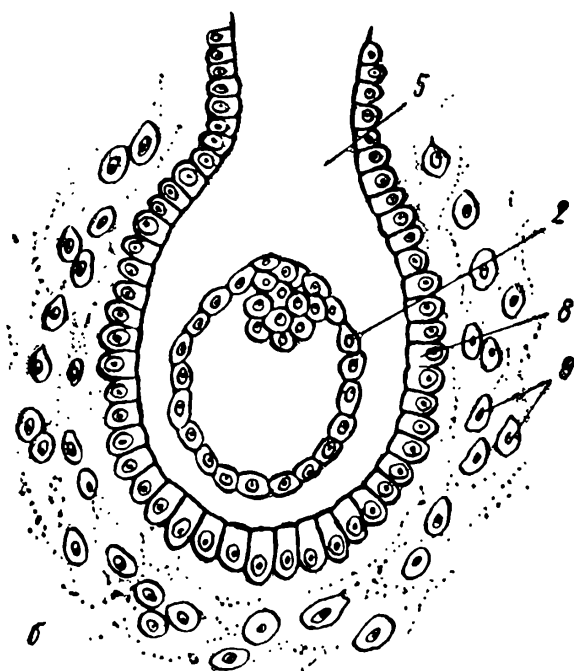
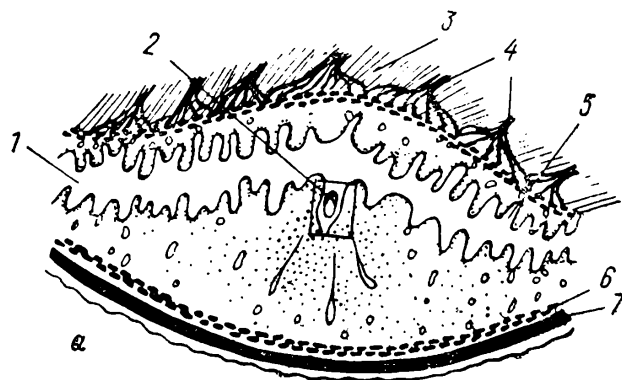


Рис. 95. Начало имплантации бластоцисты мыши.

а — продольный срез матки [Snell, Stevens, 1966], б — бластоциста в крипте матки; 1 — просвет матки, 2 — бластоциста, 3 — мезометрий, 4 — кровеносные сосуды матки, 5 — крипты, 6 — кольцевая мускулатура, 7 — продольная мускулатура, 8 — эпителий матки, 9 — ядра децидуальных клеток.

Бластоцисты равномерно располагаются по длине матки и теряют блестящую оболочку. Вследствие поглощения и накопления жидкости значительно увеличивается бластоцель. Большая часть трофэктодермы соприкасается со стенками матки. Клетки трофэктодермы, сильно уплощаясь и вытягиваясь, становятся почти незаметными среди клеток стенки матки (рис. 96, б).

Бластоцисты имплантируются в крипты вентральной (антимезометральной) стороны матки (рис. 95). Удачно ориентированные срезы можно получить как на продольных, так и на поперечных срезах через матку. При имплантации бластоцисты ВКМ направлены к мезометральной стороне матки (рис. 96). Имплантация зародышей происходит у крыс в начале 6 сут беременности, а у мышей — в конце 5 сут.

В течение нескольких часов после имплантации эпителий матки испытывает дегенеративные изменения и

полностью сбрасывается, а в более глубоких слоях слизистой оболочки матки происходит активное размножение клеток — децидуальная реакция. Клетки формирующейся децидуальной оболочки, или децидуа, богаты гликогеном, способны секретиро-

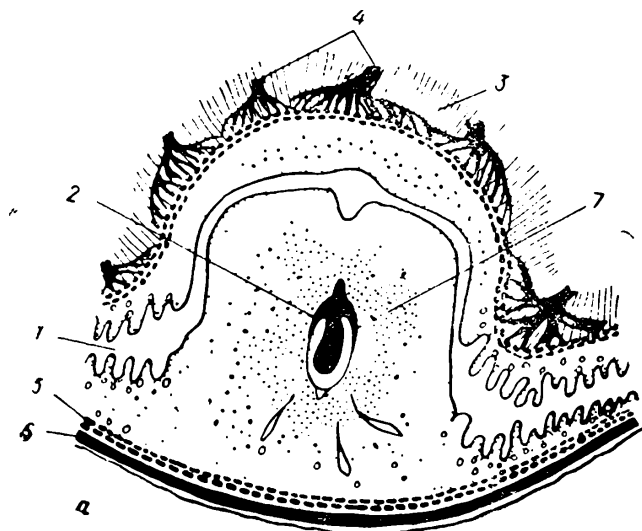
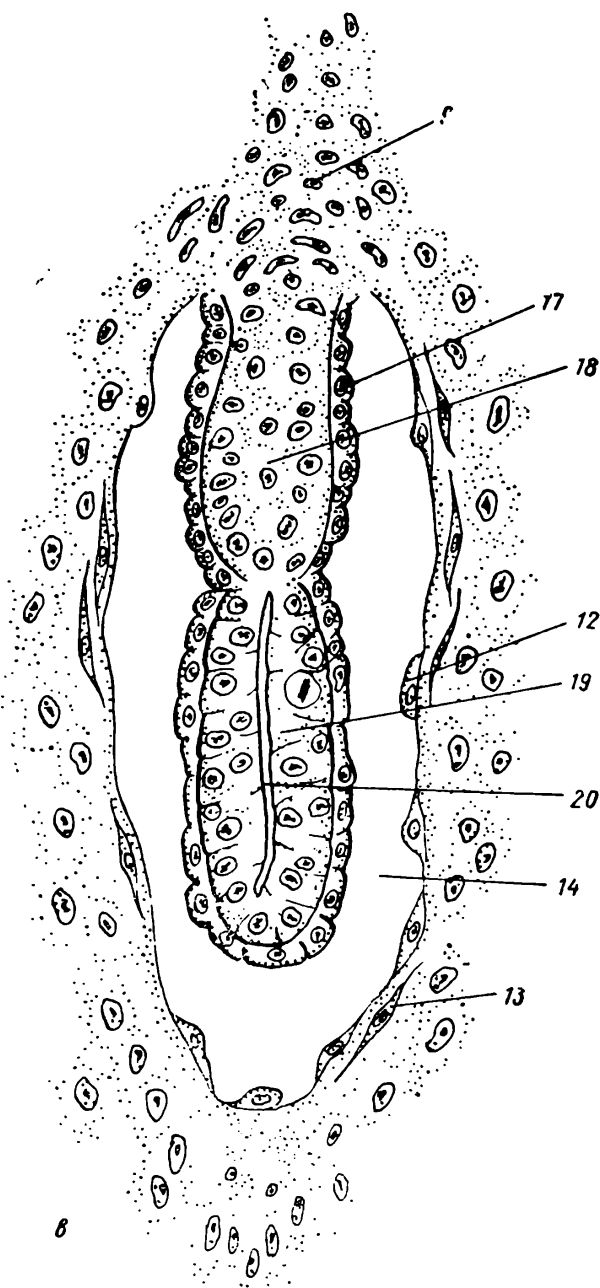
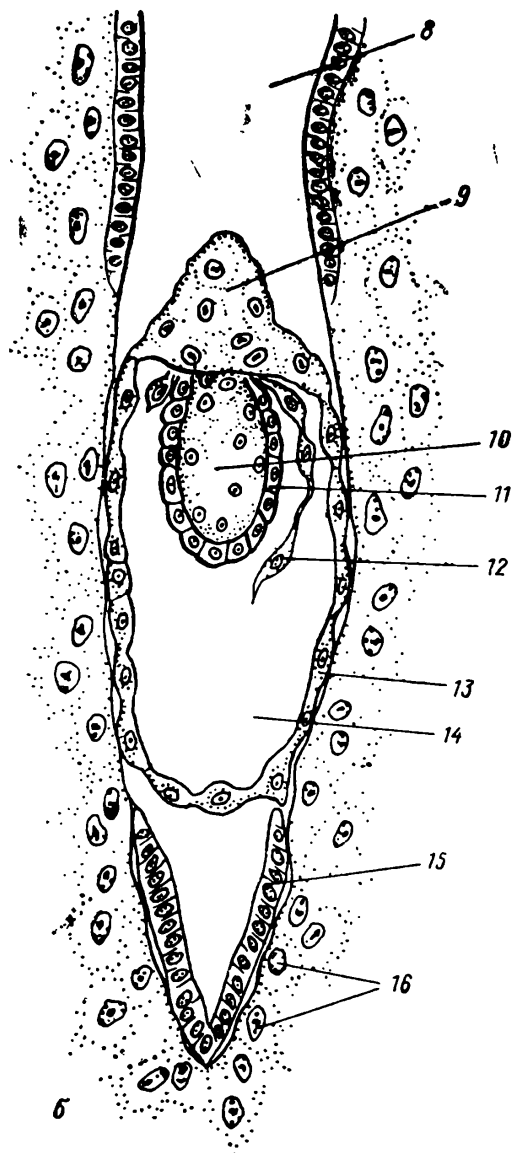


Рис. 96. Зародыш после завершения имплантации.

a — продольный срез матки мыши [Snell, Stevens, 1966], *б* — двухслойная бластоциста крысы, *в* — зародыш крысы на стадии зародышевого цилиндра [Дыбан и др., 1975]; 1 — полость матки, 2 — зародыш, 3 — мезометрий, 4 — кровеносные сосуды, 5 — кольцевая мускулатура, 6 — продольная мускулатура, 7 — децидуа, 8 — крипта, 9 — эктоплацентарный конус, 10 — эктодерма, 11 — энтодерма, 12 — дистальная энтодерма, 13 — трофобластическая эктодерма, 14 — полость желточного мешка, 15 — эпителий матки, 16 — ядра децидуальных клеток, 17 — внезародышевая энтодерма, 18 — внезародышевая эктодерма, 19 — зародышевая эктодерма, 20 — проамниотическая полость.



вать фермент пролактин. Децидуальная ткань на препаратах отчетливо видна; клетки имеют крупные овальные ядра, однако клеточные границы почти неразличимы. В результате децидуальной реакции зародыш оказывается полностью изолированным от просвета матки (рис. 96, а).

Благодаря размножению клеток трофэктодермы, прилегающих к ВКМ (полярная трофэктодерма), образуется эктоплацентарный конус (рис. 96, б, в). Эта структура в дальнейшем, развиваясь и усложняясь во взаимодействии с тканями матки, дает начало плаценте. ВКМ за счет активного деления ее клеток распространяется внутрь полости бластоцеля. На внутренней, обращенной в полость поверхности ВКМ различается более темно окрашенный слой клеток, граничащих с бластоцелем, — зачаток первичной энтодермы. Остальная часть ВКМ представляет собой эпибласт, или первичную эктодерму.

От краев энтодермы вдоль внутренней поверхности трофэктодермы растут тяжи клеток дистальной энтодермы. Впоследствии она полностью выстилает трофэктодерму и вместе с ней **входит в состав** стенки желточного мешка. Таким образом, бластоцель превращается в полость желточного мешка.

На более поздней стадии (рис. 96, в) в зародышевом цилиндре намечается разделение экто- и энтодермального зачатков на отделы, принадлежащие собственно зародышу, и внезародышевые структуры. Граница между ними приблизительно соответствует небольшой поперечной перетяжке зародышевого цилиндра. Дорсальная часть эктодермы развивается во внезародышевую, а вентральная — в зародышевую эктодерму. Таким же образом разделяется и энтодермальный зачаток. В толще зародышевой эктодермы видна продольная щель, которая, распространяясь в дорсальном направлении, в дальнейшем превратится в проамниотическую полость.

Итак, на стадии зародышевого цилиндра достаточно четко разграничены зачатки собственно эмбриона (к ним относятся зародышевые эктодерма и энтодерма) и внезародышевые вспомогательные структуры: внезародышевые экто- и энтодерма и трофэктодерма с дистальной энтодермой. При этом наблюдается инверсия зародышевых слоев, поскольку энтодермальный слой лежит снаружи от эктодермального.

Стадия головного отростка и нервной пластинки на срезе (мышь — 7,5 сут, крыса — 9 сут). Зародышей рассматриваемой стадии удобно изучать на сагиттальных срезах. Для этого следует получить поперечные срезы матки. Однако процесс нейруляции можно видеть только на продольных срезах через матку, когда зародыши разрезаны поперек.

На рассматриваемой стадии по сравнению с предыдущей зародышевые и внезародышевые структуры увеличились и значительно усложнились. Между эктодермой и энтодермой уже различается слой мезодермы. Мезодерма образуется у млеко-

питающих, как и у птиц, путем миграции клеток из первичной полоски (см. с. 190), которая у мышей и крыс располагается на дистальном (мезометральном) конце зародышевого цилиндра.

Уже при первом знакомстве с препаратом видно, что на месте небольшой щели в эктодерме зародышевого цилиндра (проамниотическая полость на предыдущей стадии) теперь находятся 3 обширные полости (рис. 97). Они возникают вследствие деления проамниотической полости путем перетяжки на две, из которых одна (амниотическая) лежит ближе к вершине зародышевого цилиндра, а другая (эктоплацентарная) — ближе к его основанию. Между обеими полостями, ограниченными эктодермой, вклинивается группа мезодермальных клеток, внутри которой путем расхождения клеток образуется третья, промежуточная полость (экзоцелом).

Дно амниотической полости выстлано слоем клеток зародышевой эктодермы. Перегородка между эктоплацентарной полостью и экзоцеломом, состоящая из эктодермы и мезодермы, называется хориальной пластинкой или хорионом, а перегородка между амниотической полостью и экзоцеломом — амнионом.

На переднем конце первичной полоски в результате ее утолщения появляется головной выступ. Начиная от области головного выступа эктодерма утолщается, и этот процесс постепенно распространяется назад. В результате образуется невральная или медуллярная пластинка (рис. 97, б). За счет прогибания средней части невральной пластинки образуется продольный желоб — невральная бороздка. Возникая на переднем конце, она постепенно распространяется назад. В дальнейшем приподнятые латеральные края нервной пластинки будут сближаться и после слияния дадут нервную трубку.

Между нервной пластинкой и энтодермой возникает зачаток хорды, который обособляется от энтодермы. В последней появляется небольшое впячивание, входящее в головной выступ и соответствующее закладке передней кишки. Аналогичным способом, но позднее, появится зачаток задней кишки.

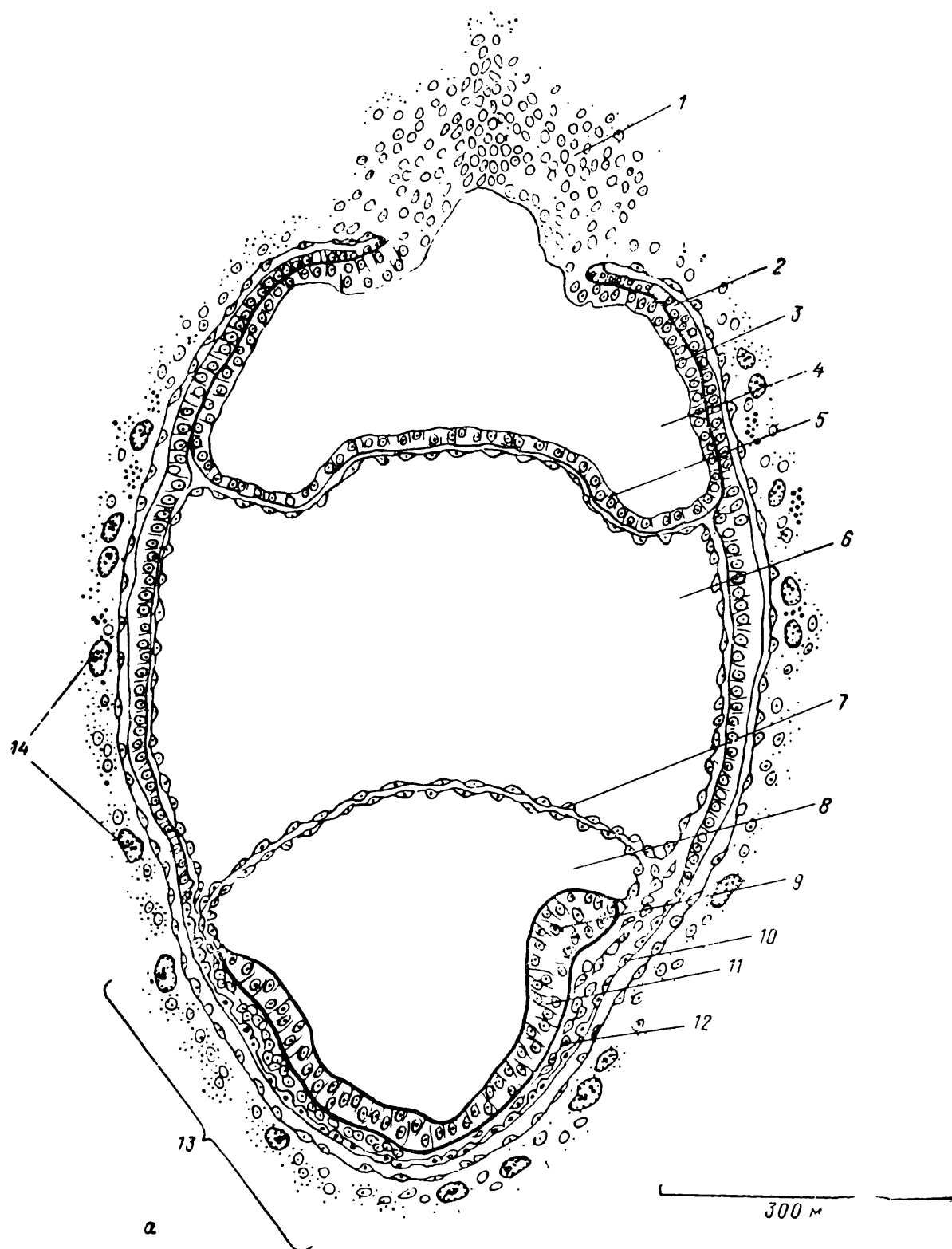
Зародыш во время развития защищен внезародышевыми оболочками. Закладки всех оболочек имеются уже на данной стадии развития. От матки зародыш отделяют почти неотличимая от материнских тканей трофобластическая оболочка и примыкающий к ней тонкий слой сильно вытянутых клеток дистальной энтодермы. Между ними располагается тонкая бесклеточная Рейхертова мембрана, которая секретится энтодермой.

Стенка желточного мешка, играющего впоследствии важную роль в питании и дыхании зародыша, представлена здесь латеральными стенками экзоцеломической полости и состоит из 2 слоев: энтодермального и мезодермального.

На рис. 96, в и 97, а видны окружающие зародыш децидуальные ткани. В децидуа различают несколько клеточных зон.

Эктоплацентарный конус окружен клетками, которые позднее примут участие в образовании плаценты. Между ними множество ячеек — лакун, заполненных материнской кровью. С противоположной стороны зародыш окружен зоной многоядерных клеток. Непосредственно к Рейхертовой мембране примыкают очень крупные многоядерные клетки — гигантские клетки трофобласта, происхождение и назначение которых не вполне ясно.

На рис. 97, б представлен фрагмент поперечного разреза за-



родыша (продольный срез через матку). В зародышевой эктодерме различаются утолщенная нервная пластинка с бороздой, проходящей в средне-сагиттальной плоскости, и латеральная эктодерма. Часть энтодермы, контактирующая с эктодермой нервной бороздки, представляет собой зачаток хорды.

Итак, наиболее существенные события этого этапа развития следующие: образование мезодермы, появление головного выступа, определившего передне-заднюю ось зародыша, закладка зачатков осевого комплекса органов (хорды, нервной пластинки).

Стадия глубокого нервного желобка на срезе (мышь — 8,5 сут, крыса — 9,5 сут). На сагиттальном срезе через зародыш этой стадии (рис. 98) видно, что он S-образной формы, эктодерма по-прежнему обращена внутрь амниотической полости, т. е. инверсия зародышевых слоев сохраняется. Выделяется своими размерами расширенный головной выступ. Мезодермальные клетки проникли в головной выступ и образовали там рыхлое клеточное скопление. Впереди кишечного впячивания на головном конце зародыша из группы мезодермальных клеток начал формироваться зачаток сердца. В отличие от многих других позвоночных сердце у грызунов формируется не из парного, а из единого зачатка, имеющего вид U-образной полый трубки. На срезе он выглядит как один или два тонкостенных пузырька.

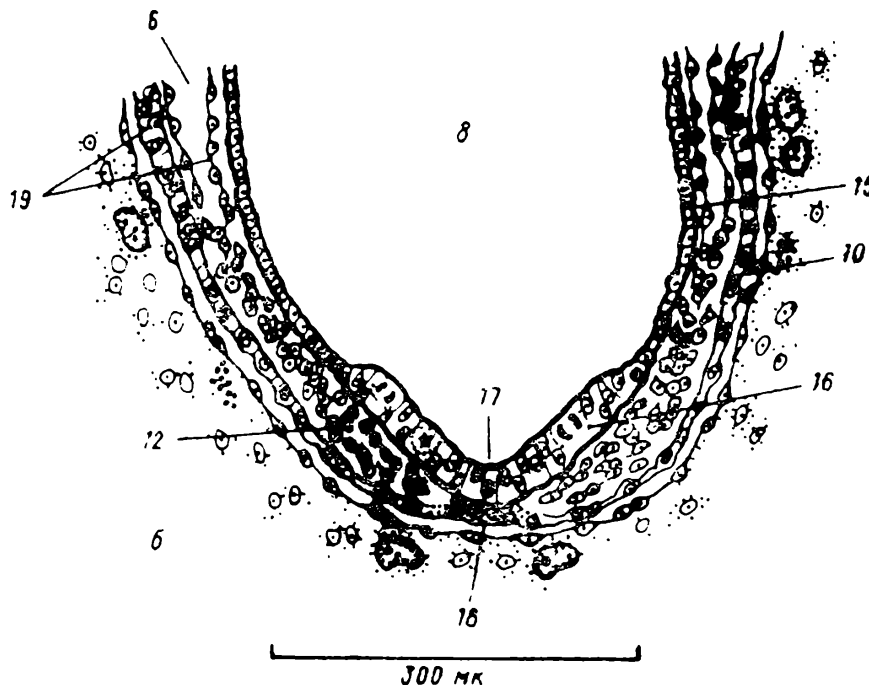


Рис. 97. Зародыш крысы на стадии головного отростка и нервной пластинки.

а — сагиттальный и б — поперечный срезы (ув. 10×20); 1 — эктоплацентарный конус, 2 — дистальная энтодерма, 3 — висзародышевая эктодерма, 4 — эктоплацентарная полость, 5 — хорион, 6 — экзоцелом, 7 — амнион, 8 — амниотическая полость, 9 — головной выступ, 10 — зародышевая энтодерма, 11 — зародышевая эктодерма, 12 — мезодерма, 13 — первичная полоска, 14 — гигантские клетки трофобласта, 15 — латеральная зародышевая эктодерма, 16 — нервная пластинка, 17 — нервная бороздка, 18 — хорда, 19 — латеральная мезодерма.

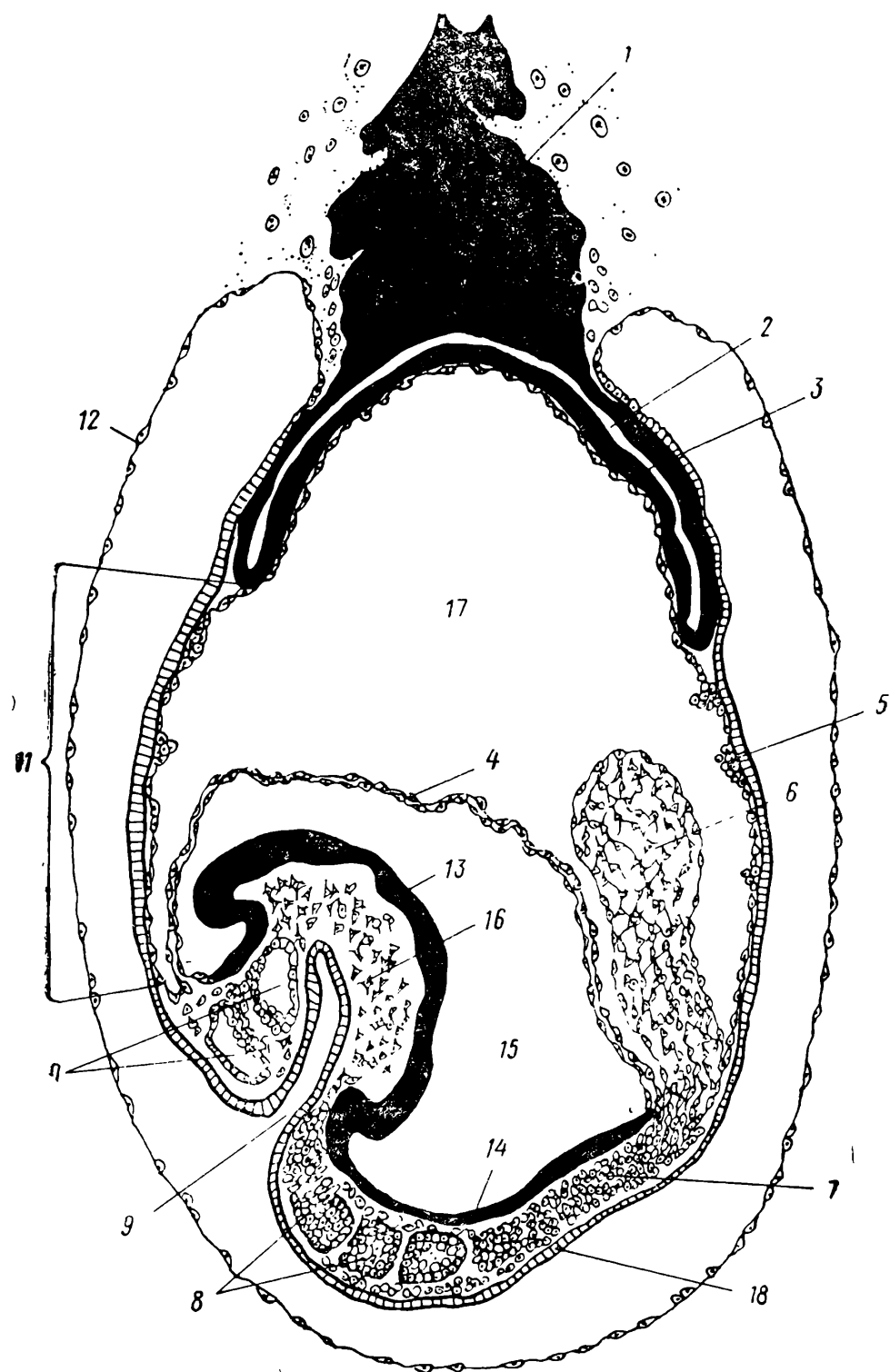


Рис. 98. Сагиттальный срез зародыша крысы на стадии глубокого нервного желобка. Ув. 7×10 .

1 — эктоплацентарный конус, 2 — эктоплацентарная полость, 3 — хорион, 4 — амнион, 5 — мезодерма кровяного островка, 6 — аллантоис, 7 — туловищная мезодерма, 8 — сомиты, 9 — передняя кишка, 10 — зачаток сердца, 11 — стенка желточного мешка, 12 — дистальная энтодерма, 13 — головной выступ, 14 — эктодерма, 15 — амниотическая полость, 16 — мезенхима, 17 — экзоцелом, 18 — энтодерма.

В туловищном отделе зародыша видны первые парные сомиты, которые дифференцируются из мезодермального зачатка; процесс этот начинается спереди и постепенно распространяется назад. У крысы образуется 65 пар сомитов.

На каудальном конце зародыша видно другое мезодермальное образование — аллантоис. В отличие от птиц, у которых аллантоис имеет полость, выстланную энтодермой и связанную с кишкой, у грызунов это исключительно мезодермальный орган губчатого строения. Он образуется в результате врастания мезодермы из каудального конца первичной полоски в экзоцеломическую полость. Позже свободный конец аллантоиса достигнет хориальной пластинки и сольется с ней.

Эктоплацентарная полость представляет собой щелевидное пространство. Она сплюснулась из-за прогибания хориона в сторону эктоплацентарного конуса, который позже примет участие в формировании плаценты. Из мезенхимных клеток, составляющих аллантоис, возникнут кровеносные сосуды, обеспечивающие непрерывную связь между зародышем и матерью.

В стенке желточного мешка, граничащей с экзоцеломом, заметны отдельные утолщения внутреннего мезодермального слоя. Это — кровяные островки, образование которых предшествует формированию сети кровеносных сосудов желточного мешка. До начала функционирования плаценты питание зародыша происходит путем адсорбции питательных веществ поверхностью желточного мешка из крови окружающих зародыш материнских тканей, а их перенос с помощью желточного круга кровообращения.

Главными событиями в развитии зародыша к описываемому моменту были значительное развитие и дифференцировка мезодермального зачатка, в результате чего появились сомиты, аллантоис, сердце, кровяные островки желточного мешка.

Зародыши поздних стадий развития на тотальных препаратах (мышь — 10—13 сут, крыса — 11—14 сут). На рис. 99 изображены зародыши нескольких последующих стадий развития, освобожденные от всех оболочек. За это время произошел ряд существенных событий. Зародыш совершил сложное перемещение: его туловищный отдел впячивался в амниотическую полость с одновременным поворотом на 180° на правый бок. Поворот начинался с головного отдела, затем вовлекался хвостовой и в последнюю очередь туловищный отделы. В результате пространственного перемещения возникло дефинитивное соотношение зародышевых слоев, а вследствие сближения и слияния краев латеральных отделов зародышевых экто-, мезо- и энтодермы эмбрион обособился от внезародышевых частей. Изменилась кривизна туловищного отдела. Зародыш из S-образного превратился в С-образный, причем выпуклая его сторона соответствует дорсальной, а вогнутая — вентральной стороне. Во время поворота происходило развитие всех закладок и по-

являлись новые. Значительно увеличились полости амниона и желточного мешка и полностью заключили в себя зародыш. Начался этап активного органогенеза.

На рис. 99, *а* показан зародыш, сильно продвинувшийся в развитии по сравнению с зародышем предыдущей стадии (см. рис. 98). У него имеется крупный головной отдел с закладками глазных пузырей на уровне переднего мозгового пузыря и слуховыми плакодами на уровне заднего. Нервная трубка еще незамкнута: на противоположных концах зародыша остались передний и задний невропоры. В средней части туловища активно развивается сердце. В энтодерме передней кишки появились зачатки некоторых отделов будущего пищеварительного тракта: глотки, пищевода, желудка. В шейном отделе у зародыша образовались 3 пары жаберных дуг — крупных эпидермальных выступов, заполненных мезенхимой, превращающейся в хрящ. Из выроста стенки первичной кишки образуются печень, поджелудочная железа и желчный пузырь.

У зародышей, изображенных на рис. 99, *а* и *б*, видны зачатки передних и задних конечностей. Передние конечности появляются раньше, чем задние и опережают их в развитии почти до самого конца эмбриогенеза. Зачатки конечностей выглядят вначале продольными валиками; передние закладываются на уровне 8—14-й пары сомитов, а задние — на уровне 28—31-й пары. Появилась еще одна пара выступов спереди от I пары жаберных дуг. Это парные зачатки верхней челюсти (рис. 99, *б*). Усиленно растет хвостовой отдел зародыша. Зачаток головного мозга расчленяется на мозговые пузыри, соответствующие конечному, промежуточному, среднему, продолговатому мозгу и мозжечку. Невропоры закрываются. На уровне конечного мозга в виде эктодермальных плакод закладывается орган обоняния. У зародыша, изображенного на рис. 99, *б*, жаберные дуги I пары сблизилась своими дистальными концами и начинают сливаться, формируя закладку нижней челюсти.

Характерные приметы зародышей 13 сут развития (рис. 99, *в*) заключаются в следующем: закладки передних конечностей выглядят уплощенными пластинками, а задние — пологими выступами. Дистальная часть передней конечности — пальцевая пластинка, становится округлой в результате поперечной перетяжки в основании зачатка, а задняя конечность переходит к стадии пальцевой пластинки. В головном отделе зародышей щель, разделявшая I и II пары жаберных дуг в результате слияния их дистальных частей превращается в щелевидное отверстие наружного слухового прохода. Глаза пигментируются. Обонятельные плакоды впячиваются внутрь. Формирующаяся нижняя челюсть и закладки отростков верхнего неба дают начало развитию ротовой полости. Брюшная стенка у зародышей остается незакрытой и часть кишечника находится снаружи (на ри-

сунках этого не видно), образуя временную так называемую пупочную грыжу.

Зародыш на рис. 99, *г* имеет уже полный набор сомитов. Изменилась его форма: дорсальная сторона туловища почти выпрямилась, но сохранился шейный изгиб. В закладках ко-

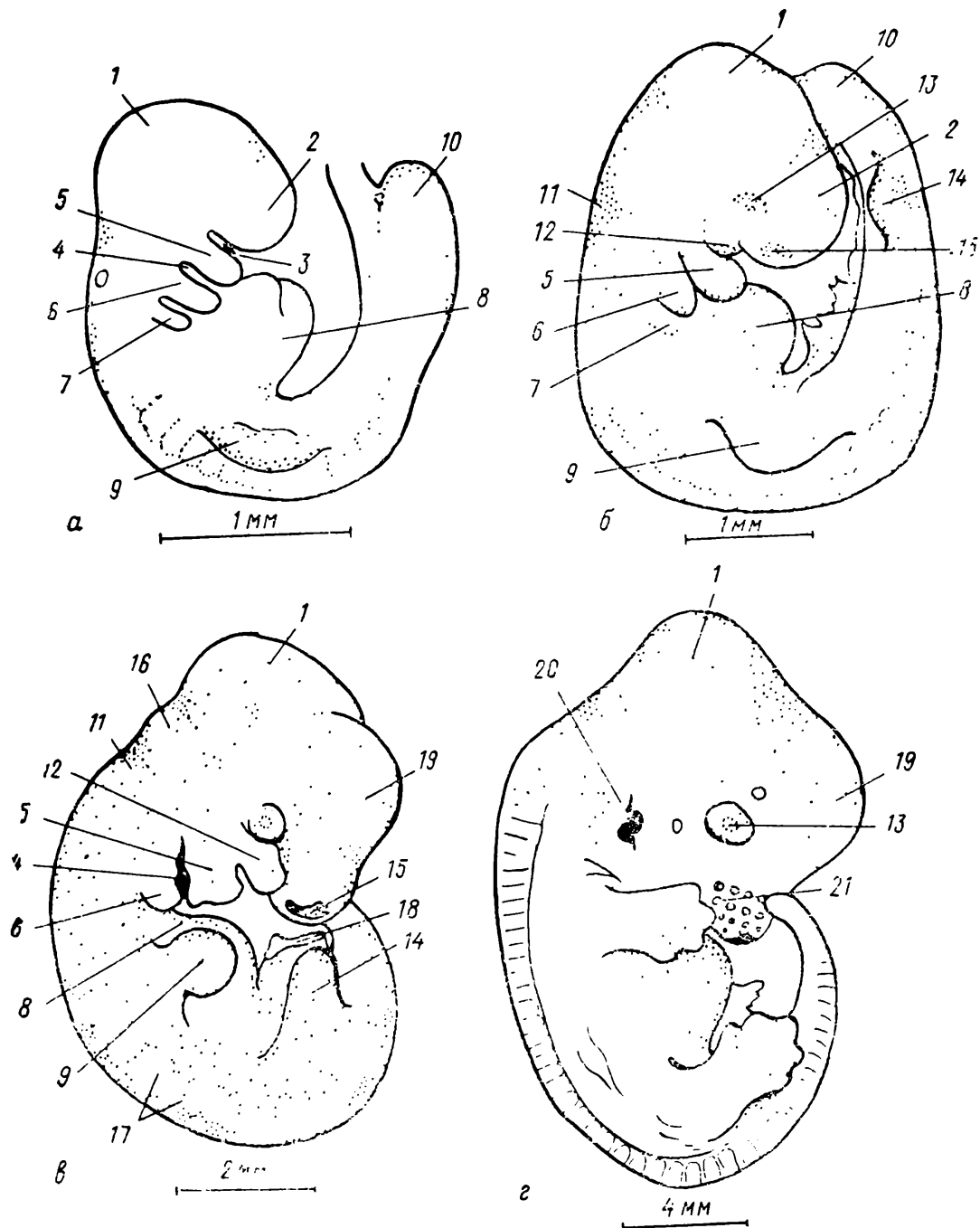


Рис. 99. Зародыш крысы на стадиях позднего органогенеза [Дыбан и др., 1975].

а — г — стадии органогенеза: *а, б* — почек передних (*а*) и задних (*б*) конечностей, *в* — пальцевой пластинки задних конечностей и превращения *1* жаберной щели в слуховой проход, *г* — стадия округлого слухового отверстия и первых вибрисс; *1* — средний мозг, *2* — передний мозг, *3* — ротовая бухта, *4* — жаберная щель, *5—7* — жаберные дуги (*5* — I, *6* — II, *7* — III), *8* — сердечно-печеночный выступ, *9* — почка передних конечностей, *10* — хвост, *11* — продолговатый мозг, *12* — верхнечелюстной отросток, *13* — глазной пузырь, *14* — почка задней конечности, *15* — обонятельная плакода, *16* — мозжечок, *17* — сомиты, *18* — пупочный канатик, *19* — конечный мозг, *20* — слуховое отверстие, *21* — зачатки вибрисс.

нечностей хорошо видны зачатки будущих пальцев. Слуховой проход оформился в округлое отверстие. Вокруг глазных яблок появились кожные складки будущих век, а на верхней челюсти — бугорки зачатков вибрисс.

В дальнейшем происходит смыкание век, появляются ушные раковины, оформляются пальцы на обеих парах конечностей. Все тело теперь уже плода покрывается бугорками волосяных фолликулов, закрывается брюшная стенка, исчезает шейный изгиб; плод набирает массу.

Продолжительность беременности у мыши 19—20 дней, а у крысы 21—22 дня.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

- Белоусов Л. В. Введение в общую эмбриологию. М., 1980. 210 с.
Иванов П. П. Общая и сравнительная эмбриология. М., 1937. 809 с.
Иванов А. В., Полянский Ю. И., Стрелков А. А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. М., 1981. 504 с.
Кнорре А. Г. Краткий очерк эмбриологии человека. М., 1967. 268 с.
Роскин Г. И. и Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. М., 1957. 467 с.
Токин Б. П. Общая эмбриология. М., 1977. 509 с.
Шмидт Г. А. Эмбриология животных. М., 1951, т. 1. 354 с.; 1953, т. 2. 404 с.

К главе 1

- Айзенштадт Т. Б. Цитология оогенеза. М., 1984. 247 с.
Данилова Л. В. Ультраструктурное исследование сперматогенеза. М., 1978. 205 с.
Равен Х. Оогенез. М., 1964. 304 с.
Рузен-Ранге Э. Сперматогенез у животных. М., 1980. 255 с.
Современные проблемы оогенеза. М., 1977. 319 с.
Современные проблемы сперматогенеза. М., 1982. 155 с.
Соколов И. И. Цитологические основы полового размножения у животных. — В кн.: Руководство по цитологии, т. II. М.; Л., 1966, с. 390—460.
Norrevang A. Oogenesis in *Priapulus caudatus* Lamarck. — Vidensk. Medd. fra Dansk natur. Foren, 1965, bd 128, s. 1—75.

К главе 2

- Дондуа А. К. О развитии *Rathkea ostopunctata*. — Уч. зап. ЛГУ, 1952, № 145, с. 166—171.
Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Простейшие и низшие многоклеточные. Новосибирск, 1975. 370 с.
Мечников И. И. Эмбриологические исследования медуз. — Акад. собр. соч., т. III, 1955, с. 172—295.
Наумов Д. В. Гидроиды и гидромедузы. Л., 1960. 320 с.
Fray J. Die Entwicklungsleistungen der Medusenknospen und Medusen von *Podocoryne carnea*. — Roux Arch., 1968, Bd 6, S. 428—464.
Kuhn A. Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsbeziehungen der Hydrozoen. — Erg. und Fortschr. Zool., 1913, Bd 4, S. 1—284.

Tardent P. Einleitung zum Gesamtwerk morphogenetische Arbeitsmethoden und Bergiffssysteme.—Coelenterata, Cnidaria. Jena, 1978. 415 S.

К главе 3

Завадовский М. М., Сидоров К. М. Зависимость развития яиц *Ascaris megaloccephala*, *Ascaris suilla*, *Toxascaris limbata* от температуры. — Тр. Лаб. эксп. биол. Моск. зоопарка, 1927, т. 3, с. 159—182.

Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Простейшие и низшие многоклеточные. Новосибирск, 1975. 370 с.

Boveri Th. Die Entwicklung von *Ascaris megaloccephala*. — Festschr. f. Kupfer, 1898, S. 383—430.

К главе 4

Дондуа А. К. Влияние актиномицина и сибиромиина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens*. — Онтогенез, 1975, т. 6, с. 475—484.

Иванов П. П. Первичная и вторичная метамерия тела. — Журн. общ. биол., 1944, т. 5, с. 61—95.

Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Трохофорные, щупальцевые, щетинкочелюстные и погонофоры. М., 1977. 312 с.

Свешников В. А. Морфология личинок полихет. М., 1978. 150 с.

Ушаков П. В. Многощетинковые черви дальневосточных морей СССР. М., 1955. 445 с.

Wilson E. B. The cell-lineage of *Nereis*. — J. Morphol., 1892, vol. 6, p. 362—462.

К главе 5

Иванова-Казас О. М. Очерки по сравнительной эмбриологии перепончатокрылых. Л., 1961. 266 с.

Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Неполноусые. М., 1981. 207 с.

Иванова-Казас О. М., Иванова Н. А. Метаморфоз пилильщика *Pontania carpaea*. — Энт. обозр., 1964, т. 43, с. 503—511.

Eastham L. E. A contribution to the embryology of *Pieris rapae*. — Quart. J. Micr. Sci., 1927, vol. 71, p. 353—394.

Eastham L. E. The embryology of *Pieris rapae*. — Philos. Trans. Roy. Soc. London, B, 1930, vol. 219, p. 1—50.

Johannsen O. A., Butt F. Embryology of insects and myriapods. New York, 1941. 462 p.

Köhler W. Die Entwicklung der Flügel bei Mehlmotte *Ephestia kühniella*. — Z. Morph. Oecol., 1932, Bd 24, S. 582—681.

К главе 6

Иванов А. В., Мончадский А. С., Полянский Ю. И. и Стрелков А. А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Ч. II. М., 1946. 630 с.

Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Иголкожные и полухордовые. М., 1978. 166 с.

Gustafson T. The cellular basis of development and behavior during sea urchin development. — In: The biology of normal human growth / Ed. by M. Ritzen et al., 1981, p. 129—137.

Gustafson T., Wolpert L. Cellular movements and contacts in sea urchin morphogenesis. — Biol. Rev., 1967, vol. 42, p. 442—498.

Kanatani H. Maturation-inducing substance in starfishes. — Intern. Rev. Cytol., 1973, vol. 35, p. 253—298.

К главе 7

Иванова-Казас О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Низшие хордовые. М., 1978. 166 с.

Conklin E. The embryology of Amphioxus. — J. Morphol., 1932, vol. 54, p. 69—151.

Hatschek B. Entwicklung des Amphioxus. — Arb. Zool. Inst. Wien., 1881, Bd 4, S. 1—88.

К главе 8

Дабагян Н. В., Слепцова Л. А., Балданова Д. Р. и Газарян К. Г. Оплодотворение и раннее дробление яйцеклеток вьюна (*Misgurnus fossilis* L.). — Журн. общ. биол., 1981, т. 42, с. 440—447.

Детлаф Т. А. Некоторые способы фиксации, проводки, заливки и окраски яиц и зародышей. Амфибии, осетровые и костистые рыбы. — В кн.: Методы биологии развития. М., 1974, с. 459—460.

Костомарова А. А. Вьюн *Misgurnus fossilis* L. — В кн.: Объекты биологии развития. М., 1975, с. 308—323.

Фалеева Т. И. Методические указания по сбору и обработке гипофизов рыб как препарата для гипофизарных инъекций. М., 1968. 16 с.

Хасан Насер Эль-Дин, Габаева Н. С. Развитие удвоенных зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis*) при экспериментальной полиэмбрионии. Архив АГЭ, 1980, т. 79, № 12, с. 56—63.

Pasteels J. Etudes sur la gastrulation des vertébrés meroblastiques. I. Teleostéens. — Arch. Biol., 1936, t. 47, p. 205—308.

Ballard W. W. A re-examination of gastrulation in teleosts. — Rev. Roum. Biol., Zool., 1973, vol. 18, p. 119—136.

К главе 9

Дабагян Н. В., Слепцова Л. А. Травяная лягушка. — В кн.: Объекты биологии развития. М., 1975, с. 442—462.

Детлаф Т. А. Методы микроскопирования. — В кн.: Методы биологии развития. М., 1974, с. 459—461.

Киришенблат Я. Д. Практикум по эндокринологии. М., 1969. 256 с.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953. 718 с.

К главе 10

Кричинская Е. Б., Ефремов В. И. Птицы. — В кн.: Методы биологии развития. М., 1975, с. 200—216.

Рагозина М. Н. Развитие зародыша домашней курицы. М., 1961. 143 с.

Рагозина М. Н. Курица *Gallus domesticus* L. — В кн.: Объекты биологии развития. М., 1975, с. 463—503.

Рольник В. В. Биология эмбрионального развития птиц. М., 1968. 237 с.

Hamburger V., Hamilton H. L. A series of normal stages in development of chick embryo. — J. Morphol., 1951, vol. 88, p. 49—92.

Hamilton H. L. Lillie's development of chick. An introduction to embryology. New York, 1952. 624 p.

Nicolet G. Analyse autoradiographique de la localisation des différentes ébauches presomptives dans la ligne primitive de l'embryon de poulet. — J. Embr. Exr. Morph., 1970, vol. 23, p. 79—108.

Romanoff A. L. The avian embryo structural and functional development. New York, 1966. 1305 p.

Rosenquist G. S. A radioautographic study of labelled grafts in chick blastoderm. — Contrib. Embryol. Carnegie Inst., 1966, vol. 38, N 259—263, p. 73—112.

Wolk M., Eyal-Giladi H. The dynamics of antigenic changes in the epi-

blast and hypoblast of the chick during processes of hypoblast primitive streak and head process formation. — *Develop. Biol.*, 1977, vol. 55, p. 33—46.

К главе 11

Дыбан А. П. Опыты на зародышах млекопитающих. — В кн.: *Методы биологии развития*. М., 1974, с. 217—244.

Дыбан А. П., Пучков В. Ф., Баранов В. С. и др. Лабораторные млекопитающие. — В кн.: *Объекты биологии развития*. М., 1975, с. 505—564.

Пучков В. Ф. Эквивалентные возрасты в эмбриогенезе цыпленка, крысы и человека. — *Докл. АН СССР*, 1959, т. 125, с. 684—687.

Brinster R. L. In vitro cultivation of mammalian ova. — In: *Advances in the biosciences*, 1969, vol. 4, p. 199—234.

Edwards J. A. The external development of the rabbit and rat embryos. — In: *Advances in teratology*, London, 1968, vol. 3, p. 239—263.

New D. A. The culture of vertebrate embryos. London, Acad. press, 1966, p. 20—43.

New D. A. Methods in Mammalian embryology / Ed. by J. C. Daniel. San Francisco, 1971, p. 305—319.

Otis E. M., Brent R. Equivalent ages in mouse and human embryos. — *Anat. Rec.*, 1954, vol. 120, p. 33—63.

Snell G. D., Stevens L. C. Biology of laboratory mouse / Ed. by E. L. Green. New York, 1966, p. 205—245.

Rugh R. The mouse. Its reproduction and development. Minneapolis, 1968. 430 p.

Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. — *Cytogenetics*, 1966, vol. 5, p. 394—400.

Tarkowski A. K. Methods in mammalian embryology / Ed. by J. C. Daniel. San Francisco, 1971, p. 172—185.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. Гаметогенез и строение половых клеток (Н. С. Габеева)	5
Глава 2. Гидрозои (Д. Г. Полтева)	37
Глава 3. Круглые черви (И. Г. Маликова)	56
Глава 4. Многощетинковые черви (И. Г. Маликова)	65
Глава 5. Насекомые (О. М. Иванова-Казас)	76
Глава 6. Иголокожие (Т. Н. Пескова, Д. Г. Полтева)	107
Глава 7. Ланцетник (Н. С. Габеева)	126
Глава 8. Костистые рыбы (Ю. К. Кузнецов)	132
Глава 9. Амфибии (Т. Н. Пескова)	157
Глава 10. Птицы (Е. Б. Кричинская)	177
Глава 11. Млекопитающие (Л. А. Конописцева)	208
Рекомендуемая литература	228

ИБ № 2170

ПРАКТИКУМ ПО ЭМБРИОЛОГИИ

Редактор *Т. Н. Пескова*

Художественный редактор *А. Г. Голубев*
 Обложка художника *В. Н. Тюлюкина*
 Технический редактор *Г. М. Матвеева*
 Корректоры *С. К. Школьников, Т. Г. Павлова*

Сдано в набор 28.05.85. Подписано в печать 30.12.85. М-28145. Формат 60×90¹/₁₆.
 Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 14,5.
 Усл. кр.-отт. 14,69. Уч.-изд. л. 15,12. Тираж 6621 экз. Заказ № 320. Цена 50 коп.
 Издательство ЛГУ имени А. А. Жданова. 199164, Ленинград, Университетская наб., 7/9.

Типография Изд-ва ЛГУ им. А. А. Жданова. 199164, Ленинград, Университетская наб., 7/9.