

УДК 597.828:591.34

КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *R. arvalis*. ЧАСТЬ 2: РАЗВИТИЕ ГОЛОВНЫХ СТРУКТУР¹

© 2012 г. Е. А. Северцова, А. С. Северцов

Московский государственный университет им М.В. Ломоносова

119899 Москва, Ленинские горы

E-mail: Severtsova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.10 г.

Окончательный вариант получен 27.09.10 г.

Анализ динамики вариабельности формирующихся головных структур головастика остромордой лягушки (*R. arvalis*) позволил выявить периоды, на которых происходит сужение пределов изменчивости их характеризующих признаков. Эти, так называемые “критические периоды”, для одних структур в процессе индивидуального развития сменяются критическими периодами для других структур. Однако для некоторых головных структур исследование индивидуальной изменчивости не позволило выявить критические стадии развития в эмбриогенезе. Возможно, это связано с анализом непродолжительного периода развития и на более поздних стадиях будет возможно выделить критические периоды в формировании таких структур.

Ключевые слова: критические периоды развития, изменчивость, *Rana arvalis*.

Представление о действии естественного отбора исключительно на поздние этапы эмбриогенеза основано еще на работах Геккеля о консервативности раннего развития и онтогенетически более позднем формированием специфических для каждого таксона черт (Richardson, 1999). Аналогичный подход используют и некоторые молекулярно-генетические исследователи (Slack et al., 1993). Тем не менее, нельзя не учитывать, что ранние стадии развития, включая деление и гастрюляцию, могут сильно различаться даже среди родственных видов (Wray, 1995; Chipman, 2002). При этом наблюдающееся ранее морфологические различия по мере развития “сходятся”, формируя так называемую филотипическую стадию, которая может совпадать с геккелевскими консервативными стадиями (Hall, 1997; Richardson, 1998). Понятие “филотипическая стадия” в современном виде определяет стадии с большим числом консервативных морфологических признаков, по сравнению с количеством специализированных признаков (Hall, 1997).

Одним из методов, позволяющим выделить такие периоды в раннем развитии может быть использование тератогенов (Shenefelt, 1972). При их воздействии происходит закономерное кратковременное повышение чувствительности зародышей

на раздражение даже ничтожной силы и, как следствие, включение цепей морфогенетических реакций и/или нарушение темпов развития отдельных закладок органов у эмбрионов (Stockard, 1921; Goldschmidt, 1938). Так формируется пластичность развития, при генетической ассимиляции которой возможны эволюционные преобразования развития (Waddington, 1953, 1956). Такой подход сближает представления классических работ Светлова о “критических периодах развития”, как о периодах детерминации (Светлов 1960, 1978) с современной теорией “филотипических стадий развития” и данных генетики развития (Richardson, 1999), в частности данных по паттерну экспрессии гомеобоксных генов (Slack et al., 1993).

Еще в 1956 году Уоддингтон писал: “Есть промежуточные периоды развития, когда эмбрионы наиболее сходны; возможно, потому, что в это время быстро закладываются основные структуры эмбрионов и для эволюции очень трудно что-то изменить в этот период без ввергания всего развития в полный беспорядок” (Waddington, 1956, с. 9). С точки зрения исследования эволюционных преобразований онтогенеза важно выявить такие стадии и не только на ранних этапах эмбриогенеза, но и на ранних этапах органогенеза. Классическим методом выявления критических периодов в развитии является оценка возрастания смертности и/или доли аномалий развития. На это указывалось и в работах Светлова и его последователей, работавших в основном с эмбрионами рыб (Трифоновна, 1954). Этот же подход применяется и в современ-

¹ Предлагаемая статья является второй частью серии статей. Часть 1 посвящена изучению критических периодов в эмбриогенезе остромордой лягушки на основе анализа общих размеров зародыша, а часть 3 — на основе пропорциональных характеристик.

ных работах, подтверждающих представление о некоторых стадиях развития, в частности стадии вылупления и предметаморфозных стадиях, как критических в развитии амфибий (Журавлева, 2009; Greulich, Pflugmacher, 2003; Mortensen et al., 2006; Gross et al., 2009).

Однако мы применили иной подход, основываясь на анализе изменчивости формирующихся структур, используя оценку вариабельности нормального развития зародышей. Впервые этот метод был предложен Дорфманом и Черданцевым, в чьих работах было введено представление об “узловых стадиях развития”, соответствующих “критическим периодам” (с. 167, Дорфман, Черданцев, 1977).

В нашей предыдущей статье, используя этот метод, мы показали, что развитие остромордой лягушки характеризуется несколькими периодами сужения пределов вариабельности анализируемых признаков (Северцова, Северцов, 2010). Эти периоды соответствовали общеизвестным критическим (узловым) периодам в эмбриогенезе: стадиям поздней гастролы, стадии вылупления и, возможно, стадии почки задней конечности. Однако мы анализировали только признаки, характеризующие размеры тела и изменения, тесно связанные с процессами роста. В предлагаемой работе нам хотелось проанализировать динамику вариабельности признаков, характеризующих не столько рост, сколько дифференциацию структур переднего отдела тела головастика. Этот интерес, прежде всего, связан с тем, что как показывают наблюдения аномальные и погибшие головастики во время критических периодов развития (например, вылупления) не имели ярко выраженных аномалий этих структур. Наиболее часто отмечались искривления позвоночника (Северцова, Северцов, 2010).

Задачей данного исследования было выявление критических периодов в формировании головных структур головастика на отрезке онтогенеза со стадии хвостовой почки до стадии почки задней конечности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на эмбрионах остромордой лягушки *Rana arvalis* Nills., собранных на нулевой стадии развития из водоемов двух районов города Москвы и подмосковного водоема. В районе Южное Бутово из водоема, расположенного на окраине Битцевского парка, примерно в полукilометре от внешнего кольца МКАД, были взяты пробы от 6 кладок. Водоем представляет собой глубокую яму, заполняемую талой водой и содержащую большое количество бытового и промышленного мусора (полиэтиленовые пакеты, автомобильные покрышки и т.п.). Второй водоем располагался в районе Востряково, в 200 метрах от

внутреннего кольца МКАД, рядом с бензозаправкой. Этот постоянный водоем пополняется как за счет талой воды, так и за счет воды, поступающей из соседних, более крупных прудов. Из него были собраны пробы от 6 кладок. Третий водоем, из которого осуществлялся сбор проб икры остромордой лягушки от пяти кладок, расположен в 50 км к западу от Москвы, на территории Звенигородской биологической станции МГУ, рядом с деревней Луцино. Этот водоем представляет собой зарастающее болото с достаточно кислой водой (рН 5.2).

Пробы икры, объемом около 100 икринок от каждой кладки, переносились в лабораторию и помещались в кристаллизаторы с водой из нативных водоемов. Температура воды поддерживалась в пределах 15–19 градусов. Стадии развития определялись согласно таблицам Дабагян и Слепцовой (1975), разработанным для травяной лягушки, но часто аппроксимируемым и на развитие остромордой лягушки. Каждые 3–4 часа по 10–15 зародышей развивающихся в кристаллизаторах фотографировали при помощи фотокамеры, установленной на бинокляре фирмы Zeisse. На стадиях от 33–34 до 39 головастика фиксировали каждые 3–4 часа по 10–15 штук. По достижении 39-й стадии эксперимент прекращали, и фотографировали фиксированных зародышей.

На основе полученных фотографий, с помощью программы Axio Vision (Zeisse) проводились промеры зародышей по следующим признакам (рис. 1): длина морды (Dl) – от основания жабр до наиболее выступающей части морды; высота морды (Vis) – от края ротовой присоски до точки наиболее выступающей части морды; ширина головы (Wg) – расстояние, измеренное по линии жаберных щелей у головастика, лежащего на спине; длина головы (Dlg) – расстояние, измеренное у головастика, лежащего на спине от линии жаберных щелей до наиболее выступающей точки морды; ширина ротовой присоски (W) – расстояние между валиками ротовой присоски; высота ротовой присоски (H) в сагиттальном направлении; ширина ротового отверстия (R) – расстояние между уголками ротового отверстия; расстояние между зрачками глаз (eye). Помимо вышеперечисленных признаков нами использовались признаки, подробный анализ которых проводился в статье, посвященной критическим периодам ростовых процессов зародышей остромордой лягушки (Северцова, Северцов, 2010). Эти признаки отмечены на рис. 1 серым цветом: общая длина зародыша (Lo); длина тела зародыша (Lb); длина хвостовой пластины (Lx) и ширина хвостовой пластины (Wx).

Полученные данные обрабатывали при помощи программ Excel и STATISTICA 6.0. Рассчитывался коэффициент вариации для каждой стадии каждой кладки. На основе однофакторного дисперсионного анализа вычислялся коэффициент

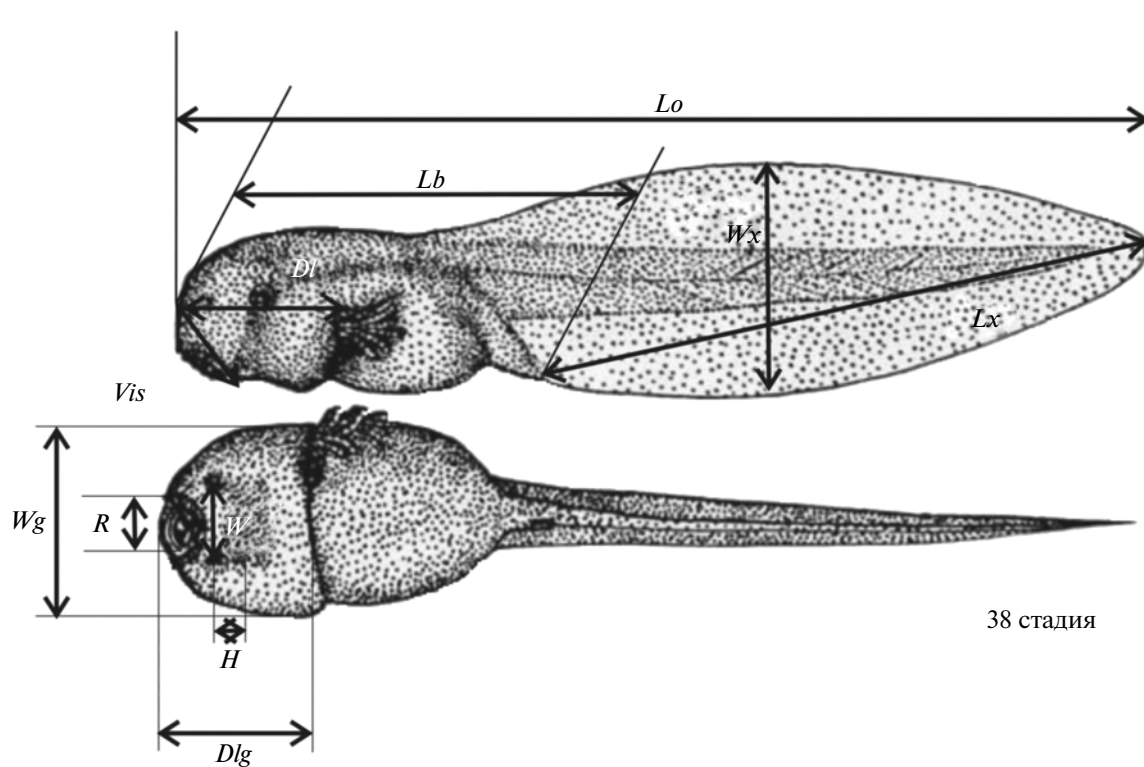


Рис. 1. Морфометрические признаки на примере 38 стадии развития остромордой лягушки (*Rana arvalis*). Обозначения признаков см. в тексте.

внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)), с помощью которого определялась доля (в %) внутрикладочной и межкладочной изменчивости. Так же рассчитывались общие коэффициенты вариации ($Cv_{\text{общ}}$), рассматриваемые нами как обобщенная характеристика вариабельности развития зародыша в целом, и коэффициенты детерминации (R^2), выступающие как показатели согласованности развития формирующихся структур зародыша.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой статье проанализированы признаки, характеризующие развитие размеров тела головастика, его ротового аппарата и месторасположения глаз. Поскольку морфометрия этих структур проводилась на довольно поздних стадиях, то мы, для обеспечения репрезентативности выборок, объединили данные для трех анализированных популяций из районов Бутово, Востряково и Луцино.

Как показывает анализ динамики изменения значений коэффициентов вариации (Cv) для некоторых признаков можно выделить стадии, которые можно рассматривать в качестве узловых стадий (рис. 2). На стадии 36 мы наблюдаем сужение межкладочной изменчивости значений Cv для признака длина морды. При этом значения Cv меняются

от 5 до 9 и в большинстве пар межкладочных сравнений различия оказываются не значимыми. Кроме того, для данного признака, значение коэффициента внутриклассовой корреляции близок к 50% (рис. 4). На следующей стадии, стадии 37, значение η^2 (%) уменьшается до 18%, что позволяет предположить, что на этой стадии очень важным оказывается определенный размер структуры, что подтверждается и сравнением между кладками средних значений “длины морды” головастика. Изменчивость признака “высота морды” (Vis) находится примерно на том же уровне, что и для признака Dl : даже к стадиям 35–36 мы наблюдаем аналогичное сужение пределов вариабельности развития (рис. 2). Однако с уверенностью выделить эту стадию в качестве узловой мы не можем, поскольку различия между Cv на 36-й стадии оказываются в большинстве случаев значимыми, а данных для анализа 35-й стадии недостаточно. Отсутствие узловых стадий на исследуемом отрезке развития подтверждает и анализ внутриклассового коэффициента корреляции: его значения меняются от 93% на 34-й стадии развития до 21% на 36-й стадии (рис. 4). По признаку “ширина головы” (Wg) мы наблюдаем сужение пределов изменчивости к 36–37 стадиям развития, причем происходит это во всех кладках, кроме одной, относящейся к группе кладок из района Востряково (рис. 2). На 36 стадии эта кладка погибла. Значе-

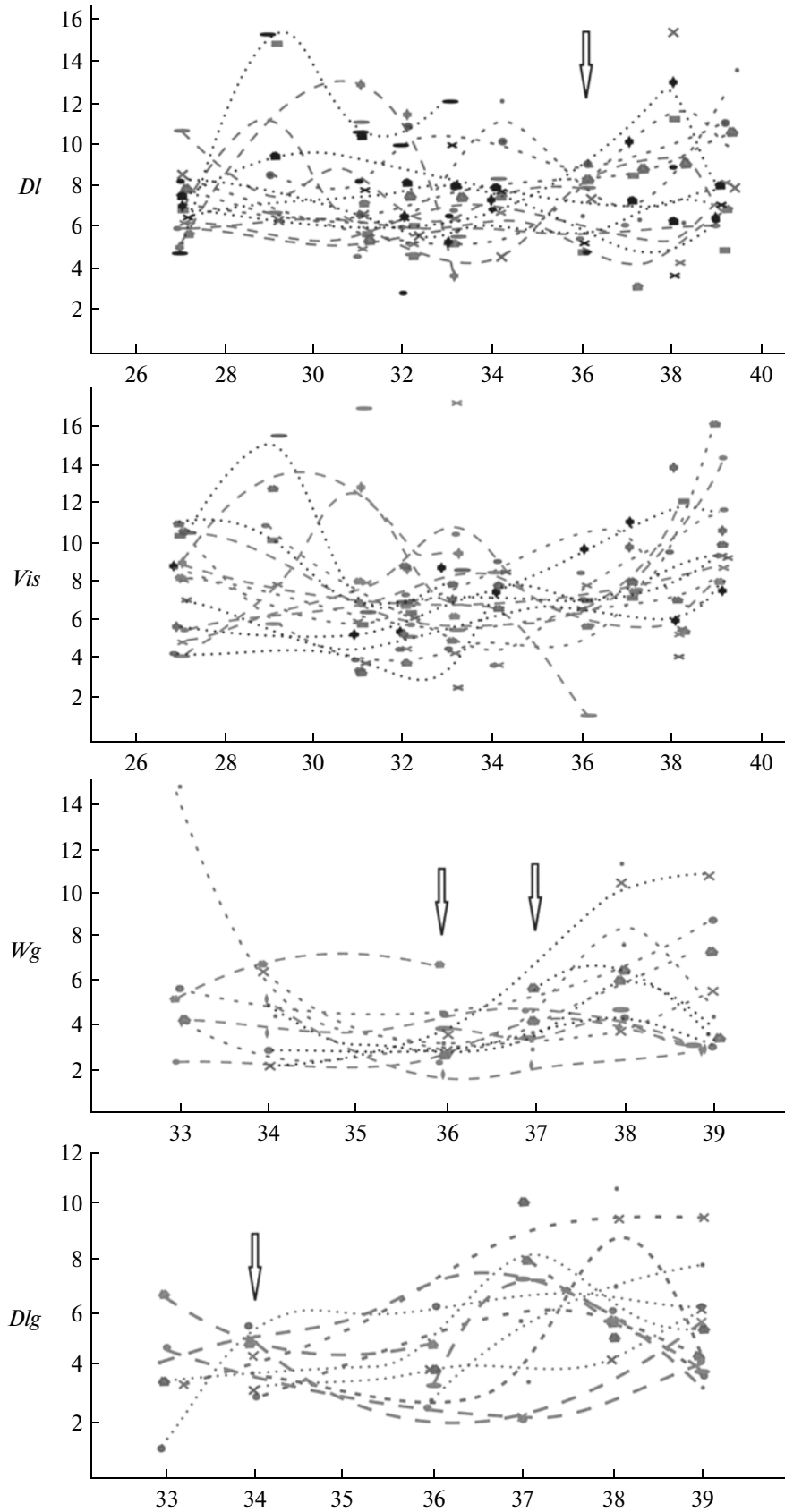


Рис. 2. Динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признаков длина морды (Dl), высота морды (Vis), ширина головы (Wg), длина головы (Dlg). По оси X – номера стадий, по оси Y – значения C_v .

ния коэффициентов внутриклассовой корреляции принимают значения, близкие к 50% на 36 и 37 стадиях (рис. 4). Более ранний этап развития можно рассматривать в качестве узлового для признака “длина головы” (*Dlg*). Значения C_v для исследованных кладок оказываются близкими на 34-й стадии развития (рис. 2) и на этой же стадии значение коэффициента η^2 (%) оказывается близким к 50% (рис. 4). Еще один признак, имеющий сужение пределов вариабельности на конкретной стадии развития, является признак “ширина ротовой присоски” (*W*). На 33 стадии развития мы наблюдаем близкие значения C_v для разных кладок (рис. 3) и значения коэффициента внутриклассовой корреляции около 50% (рис. 4). Остальные же признаки, включенные в анализ: “высота ротовой присоски” (*H*), “ширина ротового отверстия” (*R*) и “расстояние между глаз” (*eye*), — не имеют узловых стадий на анализируемом отрезке развития остромордой лягушки. Межкладочные различия в вариабельности признака “высота ротовой присоски” оказываются существенными — это вообще один из наиболее изменчивых признаков, среди включенных в анализ (рис. 3). Тем не менее, на стадии 37 мы наблюдаем значение коэффициента η^2 (%) равное 50%, хотя различия в значениях C_v оказываются значимыми (рис. 4). Они уменьшаются к 39-й стадии, к которой значения коэффициента внутриклассовой корреляции приобретают значения около 21%. Близкую картину мы наблюдаем при анализе признака “ширина ротового отверстия” — высокая изменчивость признака снижается к 39-й стадии (рис. 3), а значения коэффициента η^2 (%) становится равным 33% (рис. 4). Однако при анализе этого признака, прежде всего, следует учесть недостаточное количество данных, особенно для головастика из района Бутово. Анализ признака “расстояние между глаз” так же затруднен из-за небольшого отрезка развития, включенного в исследование. На этом отрезке, т.е. с 36-й по 39-ю стадии, включительно, выделение узловой стадии достоверно не возможно. Можно только предположить, что, как и для предыдущего признака, на эту роль может претендовать 39-я стадия.

Таким образом, из восьми признаков, анализируемых со стадии расплывтия (33–34 стадии) до стадии почки задней конечности (39 стадия), только у половины можно выделить так называемые узловые стадии. Эти стадии характеризуются сужением пределов варьирования признака, что отражается в уменьшении различий в значениях C_v при межкладочном сравнении. Кроме того, на таких стадиях развития, наблюдаются значения коэффициентов внутриклассовой корреляции близкое к 50%. На основании этих критериев нами были выделены следующие узловые стадии: для признаков “длина морды” (*DI*) и “ширина головы” (*Wg*) — 36-я стадия; для признака “длина го-

ловы” (*Dlg*) — 34 стадия, а для признака “ширина ротовой присоски” (*W*) — 33 стадия развития. Для остальных признаков, *Vis*, *H*, *R* и *eye*, — выделение узловых стадий на исследуемом отрезке развития, затруднительно. При их анализе следует учитывать, что рассматриваемый в данной работе период развития головастика оказался непродолжительным: фактически от момента закладки анализируемых структур до стадии почки задней конечности. Для этих признаков анализируемый отрезок развития составляет от 7 стадий (*Vis*) до 4-х стадий (*eye*). Возможно, узловые стадии будут наблюдаться на более поздних этапах развития.

Наши предыдущие исследования были посвящены изучению узловых стадий для признаков, характеризующих общий размер развивающегося головастика (Северцова, Северцов, 2010). В частности для признака “общая длина тела” (*Lo*) была выделена 32–33 стадии, для признака “длина туловища” (*Lb*) — 36 стадия; для признака “длина хвостовой пластины” (*Lx*) — и 32–33 стадии, и 36 стадия, а для признака “ширина хвостовой пластины” (*Wx*) — 34 стадия развития. Эта группа признаков рассматривается нами как характеристика ростовых процессов онтогенеза. Признаки же включенные в анализ данной статьи являются показателями не только роста, но и дифференциации, отражением формирования и развития структур зародыша.

На основании такого подхода, все 12 признаков, изучаемые с 27 (а для ряда признаков с 33 и даже с 36-й стадий) по 39 стадии развития были разделены на две группы. К первой мы отнесли признаки: *Lo*, *Lb*, *Lx* и *Wx*, а ко второй: *DI*, *Vis*, *Dlg*, *Wg*, *W*, *H*, *R* и *eye*. Как видно из рисунка 5А, между этими группами признаков наблюдаются различия. Признаки первой группы, характеризующие ростовые процессы демонстрируют несущественное, по мере развития, снижение общей вариабельности при значительном увеличении коррелированности. При этом коррелированность ростовых процессов резко возрастает с 29 по 32 стадии и с 34 по 36-ю, т.е. как раз на предузловых и узловых стадиях. Вторая группа признаков, напротив, характеризуется существенным возрастанием вариабельности по мере развития при низкой коррелированности. Особенно существенно изменчивость увеличивается с 37 по 38-ю стадии. Возможно, причиной такого соотношения вариабельности и согласованности развития является неоднородность признаков второй группы по своему значению. Как показано выше среди признаков этой группы присутствуют признаки, для которых была выделена узловая стадия в развитии на изучаемом отрезке онтогенеза. Имеются так же признаки, для которых не была обнаружена узловая стадия. Разделение признаков второй группы по этому критерию позволило продемонстрировать, что именно признаки, не имеющие узловых стадий (*Vis*, *H*, *R* и

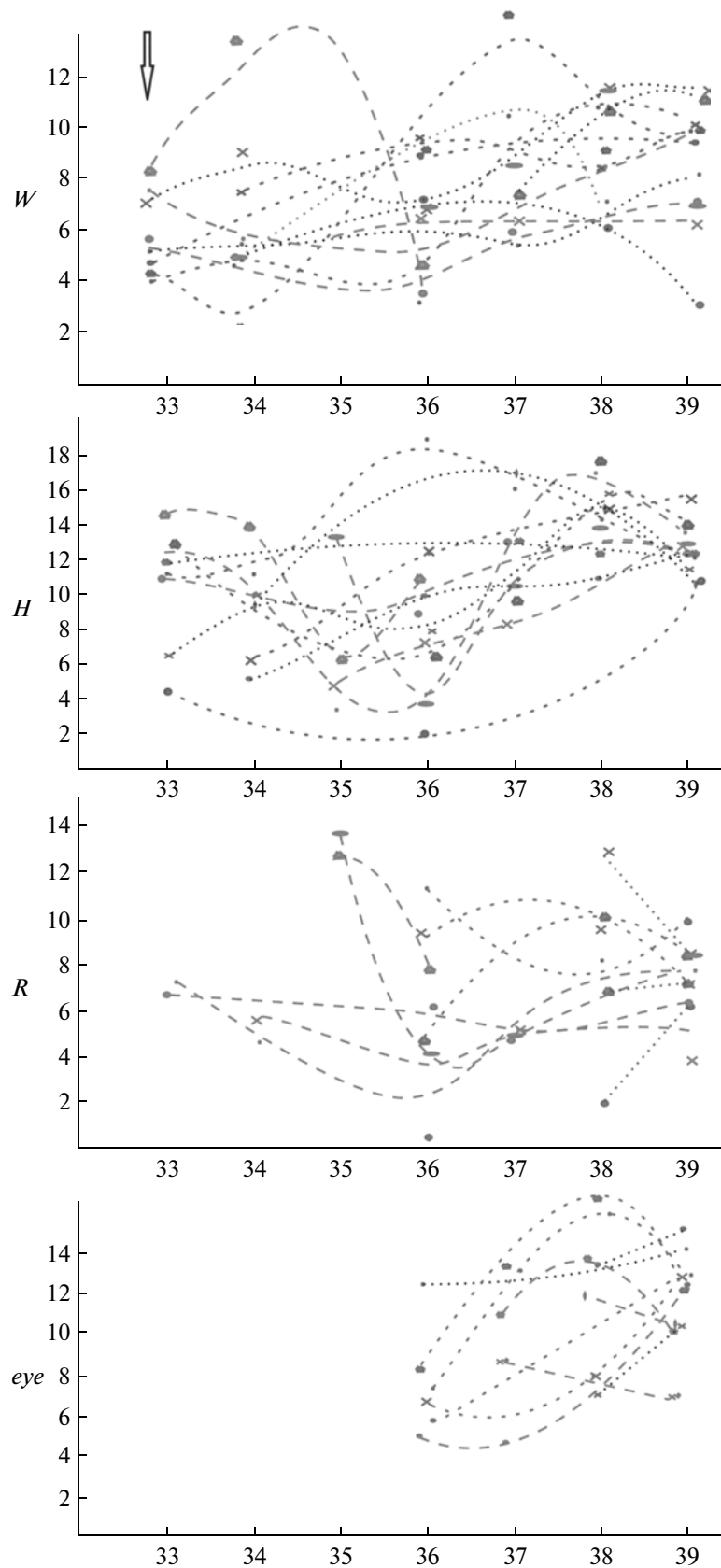


Рис. 3. Динамика значений коэффициентов вариации (C_v) признаков ширина ротовой присоски (W), высота ротовой присоски (H), ширина ротового отверстия (R), расстояние между глазами (eye). По оси X – номера стадий, по оси Y – значения C_v .

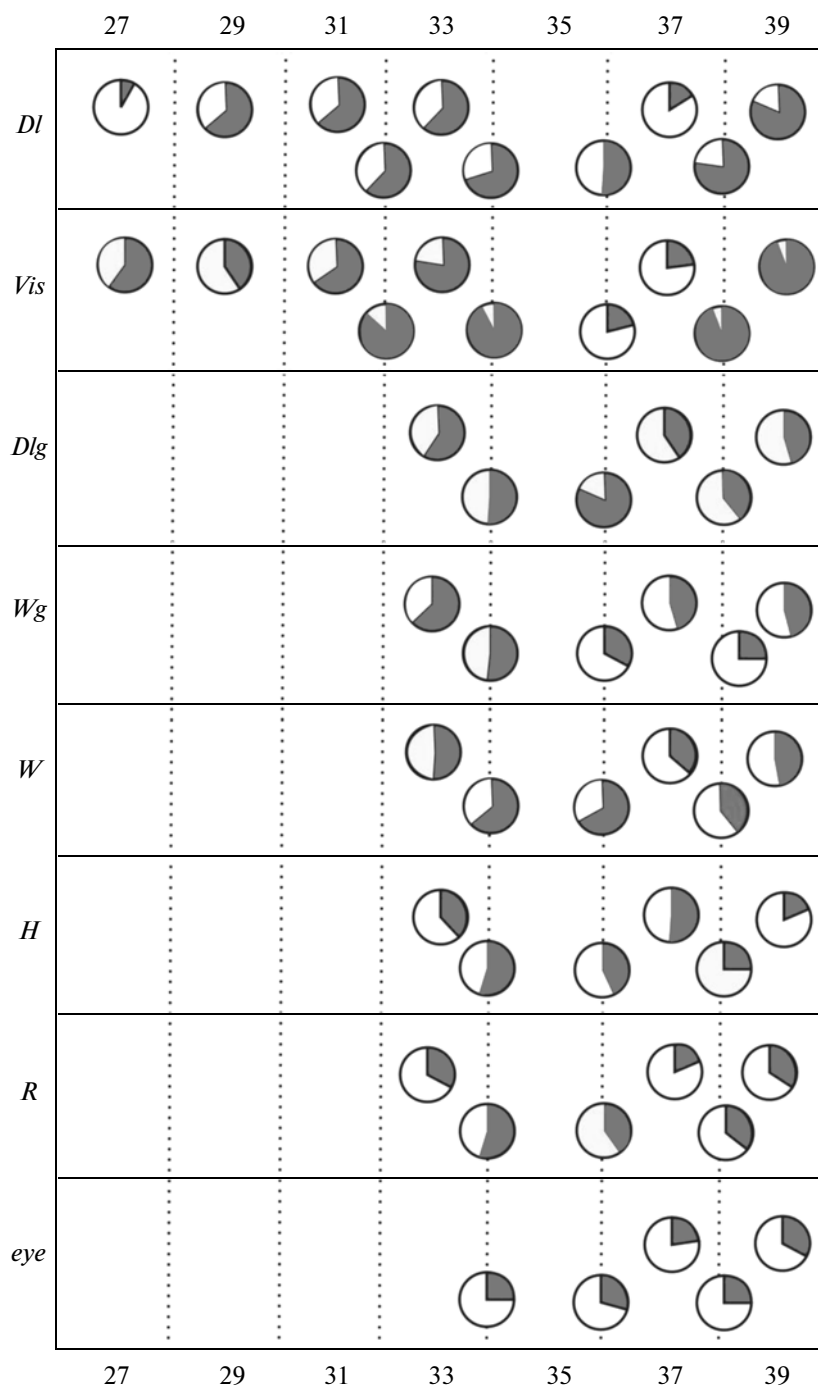


Рис. 4. Постадийная динамика значений коэффициента внутриклассовой корреляции по Фишеру (η^2 (%)). По оси X – номера стадий.

eye) характеризуются увеличением вариальности развития при низкой ее согласованности (рис. 5Б). У признаков, для которых была выделена узловая стадия, при невысоком возрастании вариальности, все-таки наблюдается и увеличение согласованности развития.

Таким образом, на основании анализа динамики изменчивости развития 12 признаков зароды-

шей остромордой лягушки можно выделить так называемые узловые стадии развития. Эти стадии характеризуются временным сокращением вариальности формирующихся структур и увеличением согласованности развития, что может быть интерпретировано, как механизм сдерживания изменчивости развития. Поскольку такую картину мы наблюдаем для всех признаков, для которых

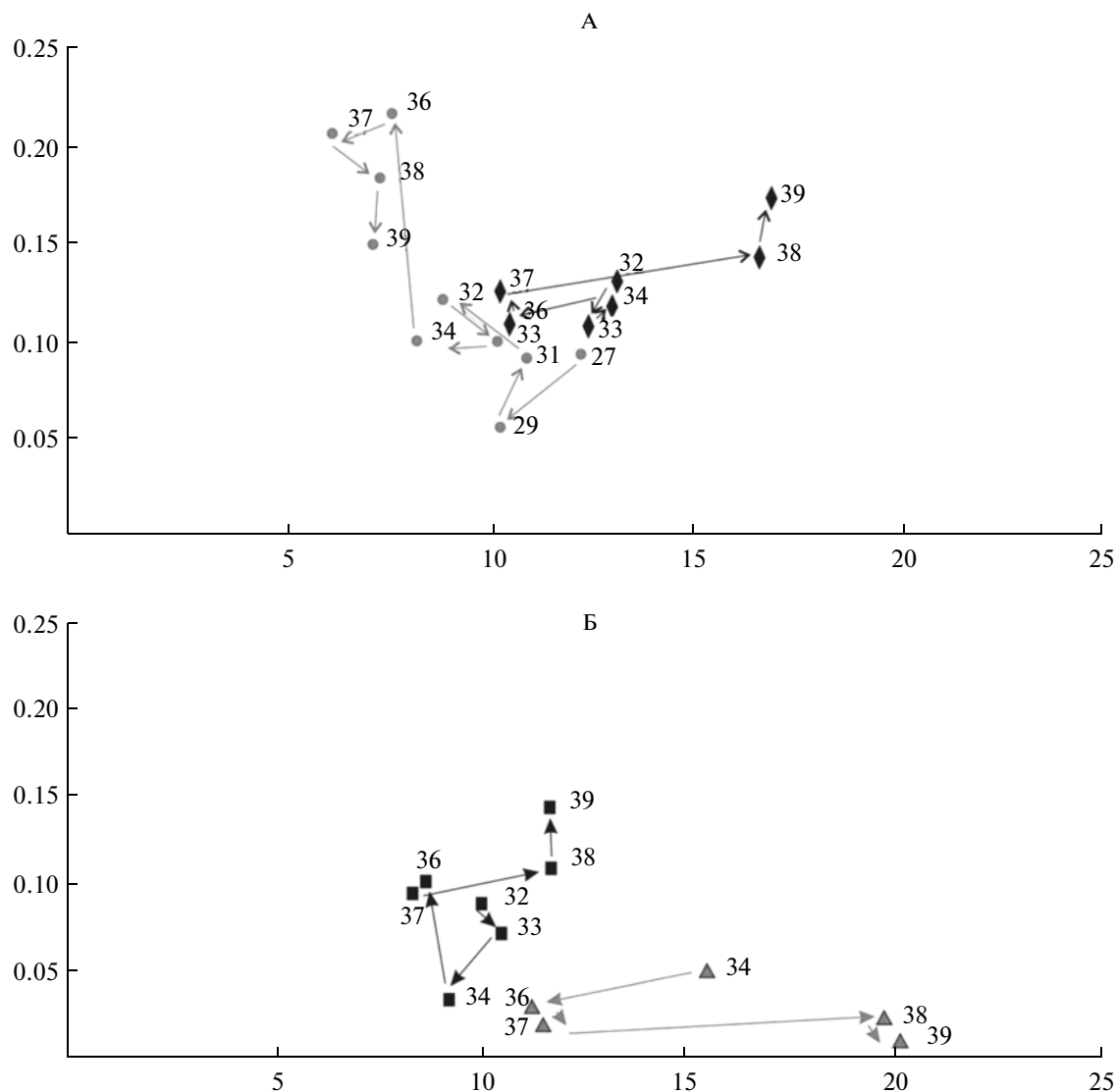


Рис. 5. Постстадийный анализ изменения значений обобщенных коэффициентов вариации ($Cv_{общ}$) (по оси X) от коэффициента детерминации (R^2) (по оси Y). Цифрами обозначены номера стадий. Рис. 5А для признаков: ● – Lo, Lb, Lx, Wx и ◆ – $Dl, Vis, Wg, Dlg, W, H, R, eye$. Рис. 5Б для признаков: ■ – для признаков Dl, Wg, W, Dlg и ▲ – для признаков Vis, H, R, eye .

мы можем выделить узловые стадии, то этот механизм, по-видимому, является универсальным для ростовых и дифференциальных процессов. Аналогичное увеличение морфологических корреляций было показано для *Danio rerio*, на стадиях, которые авторы интерпретировали как филотипические стадии развития (Schmidt, Starck, 2010).

Исследуемый период онтогенеза является насыщенным по эмбриологическим событиям. На стадии вылупление личинок из оболочек выделены узловые стадии для признаков, характеризующих общую длину зародыша, длину его хвостовой пластины и ширину ротовой присоски, с помощью которой личинки крепятся к галлертам. Со стадии расплыва становятся важными признаками, характеризующие ширину хвостовой пласти-

ны и размерные характеристики головы. Фактически, критический период для одних структур сменяется критическим периодом для других структур. Следовательно, становится понятным, почему для ряда признаков нами не были выделены узловые стадии.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00664) и Российской государственной программой “Ведущие школы” (проект № НШ-4813.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дабагян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка (*Rana temporaria* L.) // Объекты биологии. М.: Наука, 1975. С. 442–462.

- Дорфман Я.Г., Черданцев В.Г. Роль силы тяжести в раннем развитии // Внешняя среда и развивающийся организм / М.: Наука, 1977. С. 140–173.
- Журавлева Н.Г. Влияние абиотических и биотических факторов среды на выживаемость эмбрионов и молоди рыб // Вестник МГТУ. 2009. Т. 12. № 2. С. 338–343.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии / Под ред. Полянского Ю.И. М.-Л., 1960. С. 263–285.
- Светлов П.Г. Физиология (механика) развития. Л.: Наука, Т. 1. Процессы морфогенеза на клеточном и организменном уровнях. 279 С. Т. 2. Внутренние и внешние факторы развития. 1978. 263 с.
- Северцова Е.А., Северцов А.С. Критические периоды в эмбриогенезе *R. arvalis*. Часть 1: линейные размеры зародыша // Онтогенез. 2011. в печати.
- Трифонов А.Н. Изменение жизнестойкости икры рыб при смене стадий развития и при адаптации к неблагоприятным воздействиям // Тезисы докладов на XVI годичной научной сессии Института. 16–19 марта 1954. Свердловск. № 2. С. 9–11.
- Chipman A.D. Variation, plasticity and modularity in anuran development // Zoology. 2002. V. 105. P. 97–104.
- Greulich K., Pflugmacher S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure // Aquat. Toxicol. 2003. V. 19. № 65 (3). P. 329–336.
- Gross J.A., Johnson P.T., Prahl L.K., Karasov W.H. Critical period of sensitivity for effects of cadmium on frog growth and development // Environ. Toxicol. Chem., 2009. V. 28. № 6. P. 1227–1232.
- Hall B.K. Phylotypic stage or phantom: is there a highly conserved embryonic stage in vertebrates? // Trends Ecol. Evol. 1997. V. 12. P. 461–463.
- Mortensen A.S., Kortner T.M., Arukwe A. Thyroid hormone-dependent gene expression as a biomarker of short-term 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) exposure in European common frog (*Rana temporaria*) tadpoles // Biomarkers. 2006. V. 11. № 6. P. 524–537.
- Richardson M.K. Heterochrony and the phylotypic period // Dev. Biol. 1995. V. 172. P. 412–421.
- Richardson M.K., Minelli A., Coates M., Hanken J. Phylotypic stage theory // Tree. 1998. V. 13. № 4. P. 158.
- Richardson M.K. Vertebrate evolution: The developmental origins of adult variation // BioEssays. 1999. V. 21. P. 604–613.
- Schmidt K., Starck J.M. Developmental plasticity, modularity, and heterochrony during the phylotypic stage of the zebra fish, *Danio rerio* // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol., 2010. V. 15. № 314(2). P. 166–78.
- Shenefelt R.E. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment // Teratology. 1972. V. 5. P. 103–111.
- Slack J.M., Holland P.W., Graham C.F. The zootype and the phylotypic stage // Nature. 1993. V. 361. P. 490–492.
- Stockard C.R. Developmental rate and structural expression an experimental study of twins, double monsters and single deformities, and interaction among embryonic organs during their origin and development // Amer. J. Anat. 1921. V. 28. № 2. P. 115–226.
- Waddington C.H. Genetic assimilation of an acquired character // Evolution. 1953. V. 7. P. 118–126.
- Waddington C.H. Principles of Embryology. Allen & Unwin, London, 1956.
- Wray G.A. Punctuated evolution of embryos. // Science. 1995. V. 267. P. 1115–1116.

Crucial Stages of Embryogenesis of *Rana arvalis*: Part 2. Development of Head Structures

E. A. Severtsova and A. S. Severtsov

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia
e-mail: Severtsova@mail.ru

Abstract—Analysis of the dynamics of variation in developing head structures of moor frog (*R. arvalis*) tadpoles has made it possible to reveal periods in which the limits of variation in relevant traits are narrowed. In the course of individual development, these so-called crucial periods for certain traits are followed by such periods for other traits. However, crucial stages for some head structures have not been revealed, which can be explained by a relatively short period of development considered in the study. Analysis of individual variation at later stages may provide the possibility to identify crucial periods for these structures.

Keywords: crucial period of development, variation, *Rana arvalis*.