



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Сухопутова Алёна Валентиновна

**Сравнительный анализ процесса стробиляции у представителей
Scyphozoa**

Специальность 03.02.04. – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биологической эволюции биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель — кандидат биологических наук
(консультант)

Краус Юлия Александровна

Официальные оппоненты — **Марфенин Николай Николаевич**

доктор биологических наук, профессор МГУ
имени М.В.Ломоносова, кафедра зоологии
беспозвоночных, профессор

Юшин Владимир Владимирович

доктор биологических наук, член-
корреспондент РАН, Национальный
научный центр морской биологии имени А.В.
Жирмунского ДВО РАН, научный
руководитель лаборатории эмбриологии,
главный научный сотрудник

Старунов Виктор Вячеславович

кандидат биологических наук,
Санкт-Петербургский государственный
университет, кафедра зоологии
беспозвоночных, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «11» ноября 2019г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.07 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, МГУ, биологический факультет, ауд.М-1.

E-mail: ira-soldatova@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<http://istina.msu.ru/dissertations/234548785/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.Б. Солдатова

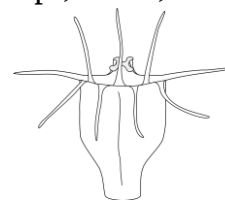
Общая характеристика работы

Актуальность работы

Cnidaria (или стрекающие) – тип беспозвоночных животных, тело которых состоит из двух эпителиальных слоев – эпидермы и гастродермы, а между ними лежит слой мезоглеи. При столь простом строении для этого типа характерно огромное морфологическое разнообразие: к книдариям относятся как гигантские колонии коралловых полипов, так и микроскопические гидроидные медузы (Вестхайде, Ригер, 2008). Простой план строения, высокая способность к регенерации и клеточным трансдифференцировкам, а также сестринское положение этого таксона по отношению к билатерально симметричным животным (Bilateria) объясняет все более частое использование представителей книдарий в качестве модельных объектов эволюционной биологии развития (например, Kirillova et al., 2018; Khalturin et al., 2019).

Тип Cnidaria состоит из групп Anthozoa и Medusozoa (Bridge et al., 1992, 1995; Collins, 2002; Вестхайде, Ригер, 2008). Представители класса Anthozoa, коралловые полипы, имеют только одну жизненную форму – полипа, как правило, являющуюся сидячим организмом. Для группы Medusozoa характерно наличие в жизненном цикле жизненной формы свободноплавающей медузы. Класс Scyphozoa – это типичные представители Medusozoa, обладающие обеими жизненными формами. Формирование медуз в этом классе происходит путем особого вида бесполого размножения полипа – стробиляции.

Класс Scyphozoa часто изучается с экологической точки зрения. Ведется поиск факторов среды, являющихся сигнальными для перехода полипов к бесполому размножению путем стробиляции. Исследуются также другие виды бесполого размножения, увеличивающие численность полипов. Этот интерес объясняется тем, что сцифомедузы способны формировать огромные скопления, т.н. роения медуз (jellyfish bloom). Эти явления создают ряд проблем для рыбного промысла, они нерегулярны и пока непрогнозируемы (Ki et al., 2008; Arai, 2009; Straehler-Pohl, 2010; Lucas, Dawson 2014). Многие исследователи предпринимали попытки найти вещества, образующиеся в процессе стробиляции и участвующие в её регуляции (Semaestomeae: *Aurelia aurita* (Spangenberg, 1967, 1972; Webb and Schrimpf, 1972;



Branden et al., 1978; Silverstone, 1978; Berking et al., 2005; Fuchs et al., 2014), *Chrysaora* (Webb and Schrimpf, 1972; Black and Webb 1973; Olman and Webb, 1974)). Сделаны первые шаги к выявлению молекулярно-генетических механизмов регуляции процесса стробилиции (Fuchs et al., 2014). К сожалению, сам процесс стробилиции авторы этих работ не описывают совсем, или, в лучшем случае, дают очень общие описания макроморфологического характера.

Описание стробилиции Scyphozoa на макроморфологическом уровне можно встретить в довольно большом количестве работ (Rhisostomeae: *Lychnorhiza lucerna* (Schariti et al., 2008); Semaestomeae: *Phacellophora camtschatica* (Widmer, 2006), *Chrysaora* (*Chrysaora lactea*, *C. hysoscella*, *C. melanaster*, *C. quinquecirrha*) (Morandini et al., 2004), *Cyanea capillata* (Delap, 1905), *Aurelia aurita* (Spangenberg, 1964, 1965; Kakinuma, 1975; Branden et al., 1978; Berking, Herrmann, 2002 и др.)). Однако лишь в единичных работах формирование эфир описано на гистологическом уровне (Coronatae: *Nausithoe maculata*, *Atorella vanhoeffeni* (Eggers, Jarms, 2007); Semaestomeae: *Aurelia aurita* (Spangenberg, 1965, 1991)).

В некоторых статьях приводится описание преобразования отдельных структур в ходе стробилиции. Например, описана дегенерация продольной мускулатуры и изменение апикальных поверхностей клеток при формировании ропалиев (Spangenberg, 1991). Проведены немногочисленные эксперименты по влиянию на процесс стробилиции ингибирования синтеза ДНК, описано развитие стробил, разделенных на фрагменты. Результаты этих экспериментов позволили сделать первые предположения об относительных вкладах разных морфогенезов в процесс формирования эфир (Semaestomeae: *Aurelia aurita* (Spangenberg, 1965; Kroiher et al., 2000)).

Опубликованные на данный момент работы дают лишь отрывочные сведения о ходе стробилиции как на макроморфологическом, так и на гистологическом и клеточном уровнях. Сравнение данных по разным видам и родам Scyphozoa представляется в связи с этим невозможным. Поэтому эволюционно пластичные и консервативные составляющие стробилиции остаются неизвестными так же, как и основные механизмы, обеспечивающие этот процесс. Между тем, стробилиция представляет собой не просто бесполое размножение, но и метаморфоз. Часть тела

полипа, то есть одной жизненной формы стрекающих, преобразуется в медузу, другую жизненную форму. Можно предположить, что этот процесс связан с масштабными морфогенетическими событиями, тканевыми и клеточными трансдифференцировками. Изучение подобных метаморфозов имеет общебиологическое значение, позволяет разобраться в основных закономерностях дифференцировки клеток и тканей, а также основных принципах формирования плана строения Metazoa.

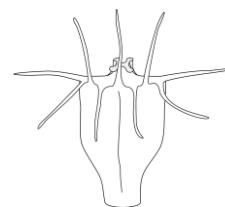
Цель работы

Дать описание и провести сравнительный анализ стробилиации на макроморфологическом, гистологическом и клеточном уровнях у сцифистом родов *Aurelia* и *Cassiopea*.

Задачи работы

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Разработать методики индукции стробилиации культур рода *Aurelia* (отряд Semaestomeae) и рода *Cassiopea* (отряд Rhizostomeae);
- Описать процесс стробилиации данных культур на макроморфологическом и гистологическом уровнях;
- Охарактеризовать морфогенезы, вовлеченные в процесс формирования эфиры;
- Выявить клеточные основы морфогенезов;
- Выявить соотношение и преемственность между частями тела полипа и медузы в ходе стробилиации;
- Провести сравнительный анализ хода стробилиации между разными культурами одного рода;
- Провести сравнительный анализ хода стробилиации между представителями разных родов и отрядов: *Aurelia* (Semaestomeae) и *Cassiopea* (Rhizostomeae);



Положения, выносимые на защиту

1. На макро-морфологическом и гистологическом уровнях существует 3 основных этапа стробилиации: индукция стробилиации; формирование и отделение эфиры; регенерация полипа. Формирование эфиры в ходе стробилиации любого из изученных сцифополипов можно описать как подготовку тканей полипа к метаморфозу; обособление диска будущей эфиры; морфогенез края диска будущей эфиры; изменение размеров и пропорций диска будущей эфиры; морфогенез гастральной системы эфиры; морфогенез мышечной и нервной систем эфиры; формирование манубриума эфиры; отделение эфиры от стробилы. Однако продолжительность и последовательность наступления этих событий видоспецифична.

2. В данной работе было показано, что в подготовке тканей полипа к метаморфозу, формировании ропалиев и гастральных нитей принимает участие пролиферация клеток; при обособлении диска эфиры происходит эвагинация гастродермы и пассивное изгибание эпидермы; а рост площади диска эфиры обеспечивается за счёт радиальной и планарной интеркаляции клеток эпителиев.

3. Между частями тела полипа и частями тела формирующейся из его ротового диска эфиры наблюдается преемственность: ропалии будущей медузы развиваются из интеррадиальных и перрадиальных щупалец полипа; лопасти развиваются из оснований этих щупалец; манубриум полностью наследуется будущей медузой от материнского полипа. Септы полипа участвуют в формировании гастральных нитей эфир.

4. Сравнительный анализ стробилиации выявил, что для медуз *Cassiopea* характерно прямое развитие. Эфира *Cassiopea*, отделившаяся от стробилы, по строению больше похожа на неполовозрелую медузу, чем на личинку – эфиру, свойственную другим изученным представителям отрядов *Rhizostomeae* и *Semaeostomeae*.

Научная новизна работы

Впервые полностью описано нормальное развитие эфиры от первых признаков стробилиации до отделения эфиры от стробилы для двух родов Scyphozoa. Выявлены основные морфогенезы, обеспечивающие стробилиацию, общие для представителей разных отрядов. Впервые показаны клеточные и тканевые перестройки, необходимые для осуществления данного метаморфоза. Также, благодаря постадийному сравнению стробилиации у двух родов Scyphozoa, выявлен ряд эволюционно пластичных элементов процесса, в частности показана тенденция к потере личиночной стадии эфиры в роду *Cassiopea*.

В данной работе определены взаимоотношения между структурами полипа и формирующейся медузы. Показан ряд гомологий, которые до нынешнего момента лишь предполагались другими авторами на основе сходства положения структур.

Научно-практическая значимость работы

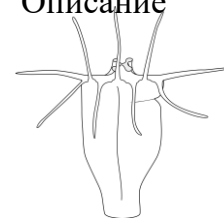
Работа носит фундаментальный характер. Таблицы нормального развития эфир, полученные в ходе исследования, могут быть использованы в образовательных целях.

Полученные данные об обеспечивающих стробилиацию морфогенезах и лежащих в их основе механизмов позволяют лучше понять природу морфогенетических перестроек, свойственных для столь эволюционно пластичной группы организмов, как Cnidaria. На основе результатов этой работы можно делать выводы о ходе эволюции морфогенезов и о взаимоотношении между разными жизненными формами внутри группы Medusozoa.

Некоторую практическую ценность представляют данные о регуляции процесса стробилиации, а именно индуцирующих факторах среды и пластичности реакции полипов на эти факторы. Данные результаты могут быть полезны для исследователей, работающих с культурами полипов в лабораториях, а также для целей предсказания и предотвращения массовых скоплений медуз Scyphozoa в морях.

Степень достоверности полученных результатов

Для исследования пластичности реакции полипов на индуцирующие факторы среды были использованы статистические методы обработки данных. Описание



морфогенезов, обеспечивающих стробиляцию, проводилось с использованием целого ряда методов: прижизненные наблюдения, световая микроскопия, гистология (парафиновые и полутонкие срезы), сканирующая электронная микроскопия, иммуоцитохимия и визуализация синтезирующих ДНК клеток с помощью метки EdU, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Основная часть отмеченных в этой работе закономерностей была показана сразу несколькими методами исследования и на нескольких (если не всех) изучаемых культурах полипов.

Личный вклад автора

Автор данной диссертационной работы непосредственно принимал участие во всех этапах работы: в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в получении данных световой и электронной микроскопии, применении методов иммуоцитохимии и мечения пролиферирующих клеток, в интерпретации полученных результатов и их представлении на конференциях и в научных публикациях.

Апробация полученных результатов

Материалы диссертации были представлены на 10 всероссийских, международных и зарубежных конференциях.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации было опубликовано 13 печатных работ. Из них 3 – статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science и RSCI; 10 работ опубликовано в материалах международных, всероссийских и зарубежных конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 202 страницах, включает в себя 73 рисунка и 1 таблицу. Диссертация состоит из 8 глав: введения, материалов, методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы из 200 источников и приложения из иллюстрационных материалов данной работы.

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены общие сведения о систематике, морфологии и жизненном цикле Scyphozoa. Сделан акцент на многочисленности и пластичности способов бесполого размножения внутри класса. Проанализированы данные о внешних и внутренних факторах индукции стробилиации. Отрывочные сведения о морфологии стробилы различных представителей Scyphozoa на разных этапах стробилиации сведены в таблицу нормального развития стробилы для последующего сравнительного анализа результатов диссертационной работы с литературными данными.

Материалы и методы

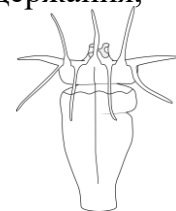
Для наших исследований были использованы 3 культуры рода *Aurelia* разного происхождения: «Вена», «Киль» и «Беломорская»; а также три культуры полипов рода *Cassiopea*: *Cassiopea xamachana* (Bigelow, 1892), *Cassiopea* sp.1 и *Cassiopea* sp.2. Во всех культурах *Aurelia* и *Cassiopea* размножение происходило только бесполом путем как минимум с 2013 года. Таким образом, полипы каждой культуры представляют собой клоны нескольких полипов-основателей.

Сцифистомы *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» и все культуры *Cassiopea* содержатся в искусственной морской воде (Профессиональная морская соль «МА», Россия) при солености 35‰, а полипы *Aurelia* культура «Беломорская» – при солености 24‰. Температура содержания для культур «Вена» и «Киль» составляет 24 и 18°C в зависимости от экспериментальной группы, для *Cassiopea* – 24°C, для *Aurelia* «Беломорская» – 6-12°C. До экспериментов полипы содержались при восьмичасовом световом дне, получали корм каждые 4 дня (науплиусы *Artemia salina*). Смена воды проводилась каждые две недели.

Индукция стробилиации

Для индукции стробилиации *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» полипы 2 недели содержались при пониженной на 6°C температуре, в темноте; полипы рода *Cassiopea* – при повышенной на 6°C температуре и круглосуточном освещении.

Для выявления наиболее надёжных способов индукции стробилиации в лаборатории, а также определения влияния на стробилиацию условий содержания,



была проведена серия экспериментов на всех культурах сцифополипов с повышением на 4-8°C и снижением на 2-15°C температуры содержания, добавлением KI в воду в расчете 1г/л, кормлением сцифистом эфирами, изменением длины светового дня (от круглосуточной темноты до круглосуточного освещения) и изменением режима кормления (от ежедневного до 1 раза в две недели). Всего в экспериментах было использовано более 1500 полипов культур «Вена» и «Киль», более 500 полипов культуры «Беломорская» и более 300 полипов каждой из трех культур рода *Cassiopea*.

Кроме того, для всех культур полипов *Aurelia* и *Cassiopea* был применен еще один способ индукции стробилиации: добавление в искусственную морскую воду 5-метокси-2-метилиндола (5-metoxy-2-methylindole в DMSO; Sigma, Германия) с получением конечной концентрации 50мкМ.

Методы исследования стробил

По стандартному протоколу для получения парафиновых срезов (толщиной 3-5 микрон), адаптированному для сцифистом, было исследовано более 20 стробил *Aurelia* каждой из трех культур; 20 стробил *Cassiopea xamachana*; 10 стробил *Cassiopea* sp.1; единичные экземпляры *Cassiopea* sp.2. Для каждой из шести культур сцифоидов было исследовано также по 5 нестробилирующих полипов.

Полутонкие срезы (0,6-0,8 микрон) были изготовлены из 13 стробил *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» и 10 стробил *Cassiopea xamachana*. У остальных культур этим методом исследованы единичные экземпляры.

Сканирующая электронная микроскопия осуществлялась в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Методами сканирующей электронной микроскопии было исследовано более 15 стробил *Aurelia* каждой из трех культур; 15 стробил *Cassiopea xamachana*; 10 стробил *Cassiopea* sp.1. Для каждой из указанных культур сцифоидов было также исследовано не менее 5 нестробилирующих полипов.

Для визуализации нервной системы были использованы методы иммуноцитохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Основная часть исследований была проведена на *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» (по 10 стробил) и *Cassiopea xamachana* (10 стробил). У остальных культур исследованы единичные экземпляры.

Выявление зон активного синтеза ДНК производили с помощью Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen). Основная часть исследований была проведена на *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» (по 10 стробил и 5 полипов) и *Cassiopea xamachana* (10 стробил и 5 полипов). У *Aurelia* культуры «Беломорская» и у *Cassiopea* sp.1 были исследованы единичные экземпляры.

Прижизненные наблюдения и съёмка велись за более чем 20 стробилами каждой из шести исследованных культур.

Результаты и их обсуждение

По нашим данным и по данным проанализированной литературы, стробилиция состоит из следующих 3-х этапов: индукция стробилиции; формирование и отделение эфир; регенерация полипа. Эти этапы едины для всех исследованных нами культур. При нормальном развитии стробилы этапы последовательно сменяют друг друга. Продолжительность каждого из этапов изменчива внутри одной и той же культуры и зависит от условий стробилиции и способа индукции стробилиции.

Индукция стробилиции

Основным сигнальным фактором в природе является сезонное изменение температуры. Именно изменение температуры воды эффективно индуцирует стробилицию большинства изученных представителей сцифоидов в лабораторных условиях. Причем для большинства лабораторных культур *Aurelia*, в том числе и наших культур «Вена» и «Киль», наиболее эффективным способом индукции стробилиции является снижение температуры содержания. Для наших культур *Cassiopea*, как и для культур этого рода из других лабораторий мира, наиболее эффективно повышение температуры содержания (Rahat, Adar, 1980; Hofmann et al., 1978).

Полипы *Aurelia* культур «Вена» и «Киль», содержащиеся при постоянной низкой температуре (18°C), демонстрируют сравнительно высокую чувствительность к изменениям температуры и склонны к спонтанной стробилиции. Содержание же полипов при высоких температурах (24°C и выше) приводит к снижению их чувствительности к изменениям температуры: увеличиваются разница температур и срок инкубации при пониженных температурах, необходимые для индукции стробилиции; снижается процент стробилирующих полипов.



Для температурной индукции стробилиации *Cassiopea* важна также длина светового дня: в темноте стробилиация наступает с меньшей вероятностью. В разных регионах мира для разных видов благоприятный для стробилиации период наступает в разное время года и сопровождается разными изменениями факторов окружающей среды. Так, среди обитателей тропиков и субтропиков отрядов Semaestomeae и Rhizostomeae, стробилиация может проходить круглый год и особенно интенсифицируется во время повышения температуры и увеличения светового дня (Calder, 1973; Rahat, Adar, 1980; Sugiura, 1996; Kawahara et al., 2006; Astorga et al., 2012). Можно предположить, что у видов, имеющих симбиотические водоросли, шел отбор на чувствительность к изменению активности симбионтов, так как изменение освещения является удобным сигнальным фактором.

Таким образом, и происхождение культуры, и её история содержания оказывают заметное влияние на способность полипов к стробилиации в ответ на изменения условий среды.

Формирование и отделение эфир

Ключевые события, составляющие этот этап, едины для всех исследованных культур сцифополипов. Последовательность, в которой они происходят, одинакова для разных культур одного рода, но различается у исследованных представителей разных отрядов (рис. 1, 2).

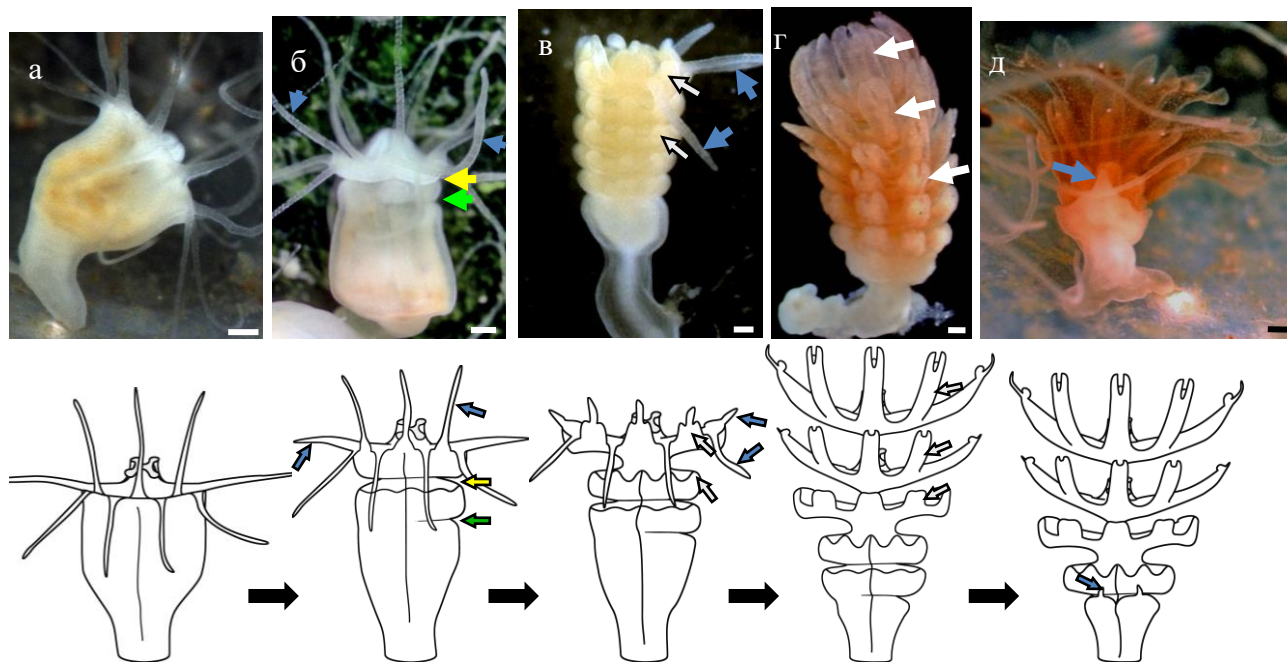


Рисунок 1. Стробилиация *Aurelia* sp. Желтая и зеленая стрелка – закладка первой и второй перетяжек, синие стрелки указывают на щупальца полипа, белые – на лопасти эфира, масштабный отрезок (мк) 100μm.

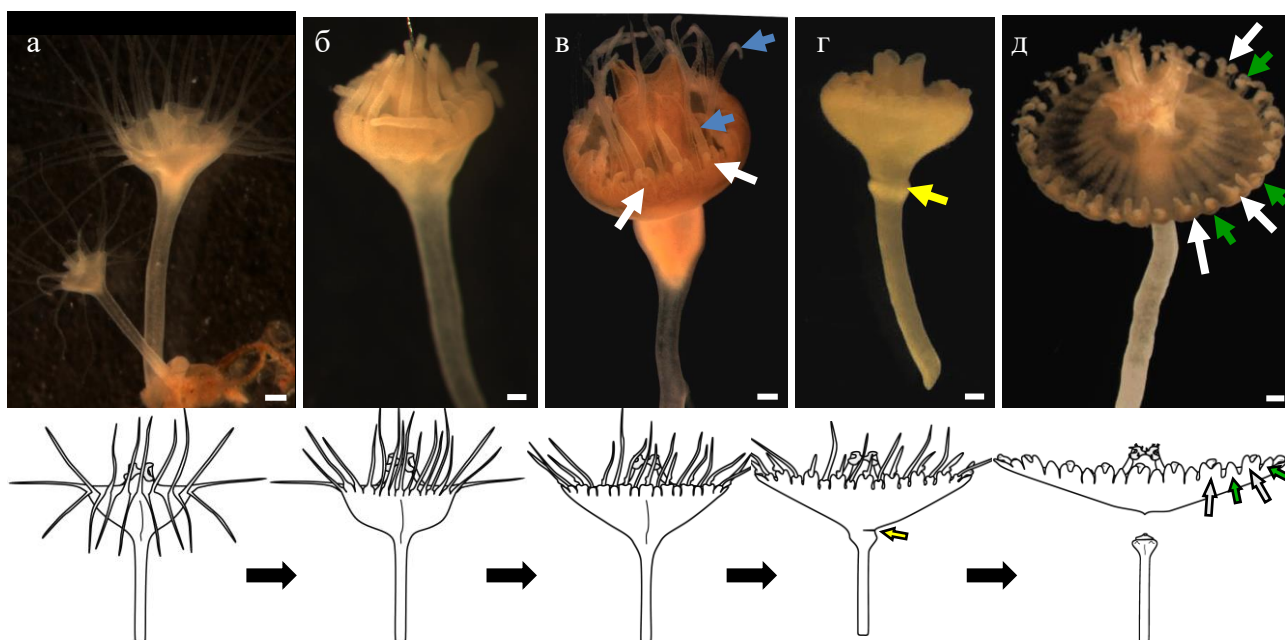


Рисунок 2. Стробилиция *Cassiopea*. Желтая стрелка – закладка единственной перетяжки, белые стрелки указывают на раздвоенные лопасти эфиров с ропалиями, зеленые – на простые, мо 100µm.

Подготовка тканей полипа к метаморфозу

Данные гистологии показывают, что изменения готовящихся к метаморфозу тканей сцифистомы появляются ещё до первых макроморфологических признаков стробилиции.

У ранних дисков стробил *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» толщина эпидермы (30-40 мкм) заметно выше, чем у нестробилирующей сцифистомы (16-20 мкм). То же наблюдается и для гастродермы: 30-40 мкм во время формирования перетяжки при 17-25 мкм у нестробилирующей сцифистомы. Однорядные кубические эпителии (эпидерма и гастродерма) нестробилирующего полипа к моменту закладки диска стробилы становятся многорядными цилиндрическими за счёт удлинения клеток в апико-базальном направлении (рис. 3). Мечение EdU показывает, что у ранней стробилы интенсивность пролиферации клеток примерно в 12 раз выше, чем у нестробилирующего полипа. В ранних дисках стробил *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» происходит самая активная клеточная пролиферация. Позже этот пул клеток может быть использован для быстрого изменения формы и размера зачатка эфиров.

Для подготовительного этапа стробилиции *C. xamachana* характерно повышение активности симбионтов, приводящее к изменению цвета стробилы, даже, если при индукции стробилиции степень освещенности полипов не менялась или была снижена.



Обособление диска будущей эфиры

Частичное обособление диска будущей эфиры от остального тела полипа является первым надежным макроморфологическим признаком начала стробилиации у *Aurelia*. У *Cassiopea* обособление диска происходит относительно поздно: когда морфогенез края диска эфиры практически завершен.

Во всех шести изученных культурах образование кольцевой перетяжки, перпендикулярной орально-аборальной оси сцифистомы, начинается с впячивания стенки тела под ротовым диском (или под оральнее расположенным диском стробилы) на одной стороне сцифистомы. Затем впячивание распространяется по кругу, замыкаясь на её противоположной стороне. Для *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» показано, что формирование перетяжки начинается в гастродерме, а форма эпидермы изменяется вслед за гастродермой. Судя по гистологическим данным, морфогенез как гастродермы, так и эпидермы происходит путём изгибания целостного эпителиального пласта. В гастродерме на этой стадии можно найти клетки, у которых базальные поверхности сокращены, а апикальные расширены и округлены, при этом клетки вытянуты в апико-базальном направлении (рис. 3а). Наличие таких «обратноколбовидных» клеток свидетельствует об активном процессе изгибания клеточного пласта – эвагинации (Gierer, 1977). Изгиб эпидермы происходит вслед за изгибом гастродермы. В эпидерме в зоне формирующейся перетяжки колбовидные или «обратноколбовидные» клетки отсутствуют (рис. 3б). Следовательно, вероятна закладка перетяжки пассивным образом. Вытяжение клеток эпидермы в апико-базальном направлении, их изогнутость, непостоянство формы и выдающиеся за поверхность эпителия апикальные концы некоторых клеток говорят о наличии давления клеток друг на друга внутри пласта.

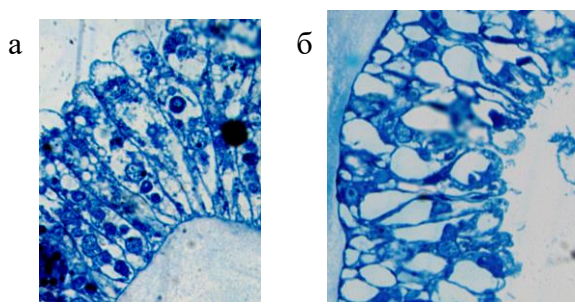


Рисунок. 3. Гастродерма (а) и эпидерма (б) в зоне формирования перетяжки, обособляющей диск эфиры от остального тела стробилы *Aurelia* sp. мо 10µm.

Во время дифференцировки диска будущей эфиры нередко наблюдается пересечение четырех и более сторон апикальных поверхностей клеток эпидермы в одной точке. Вероятнее всего, наблюдаемые «розетки клеток» являются

промежуточным результатом планарной интеркаляции в форме T1 перехода. Наличие ламелл и филоподий на апикальных поверхностях многих клеток эпидермы подтверждает это. Предположительно планарная интеркаляция участвует в процессах углубления перетяжки и расширения диска будущей эфиры.

Морфогенез края диска будущей эфиры

Морфогенез края диска эфиры, то есть дифференцировка её лопастей, у самой орально расположенной эфиры *Aurelia* начинается одновременно с началом закладки перетяжки. У *Cassiopea* дифференцировка лопастей начинается раньше всех остальных морфогенезов.

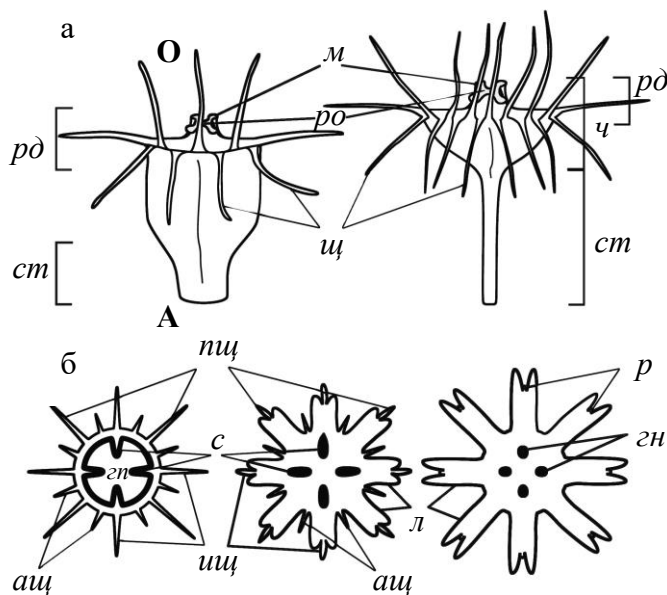


Рисунок 4. Строение и метаморфоз полипа Scyphozoa. а – полип без и с выраженным разделением на стебелёк и чашечку;

б – поперечный срез полипа с щупальцами, диска стробилы и восьмилопастной эфиры.

О – оральный конец; А – аборальный конец; рд – ротовой диск; ст – стебелек; ч – чашечка; м – манубриум; ро – ротовое отверстие; ищ – щупальца; с – септы;

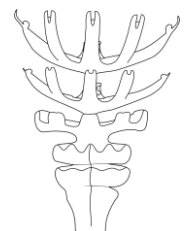
ищ – интеррадиальные щупальца;

пщ – перрадиальные щупальца;

ащ – адрадиальные щупальца; гп – гастральная полость; л – раздвоенная лопасть эфиры;

р – ропалий; гн – гастральная нить.

Редукция щупалец у всех изученных культур идет неравномерно: интеррадиальные и перрадиальные щупальца, а у *Cassiopea* еще и адрадиальные, укорачиваются быстрее остальных (рис. 1в, 2в). На месте этих щупалец начинают формироваться чувствительные органы – ропалии. Основания интеррадиальных и перрадиальных (также адрадиальных у *Cassiopea*) щупалец расширяются, в связи с чем становится заметно расположение щупалец сцифистомы в два кольца. Эти основания постепенно изменяют свою форму, разрастаются и формируют лопасти эфир (рис. 4б). Последующие эфиры (аборальные расположенные) у *Aurelia* формируются независимо от орального диска полипа. Несмотря на это, их лопасти проходят те же стадии смены формы (рис. 5) и закладываются строго под лопастями первой эфиры, то есть в интеррадиальных и перрадиальных положениях. Скорее всего, расположение зачатков лопастей диктуется положением септ, так как только эти структуры имеются во всех зачатках эфир.



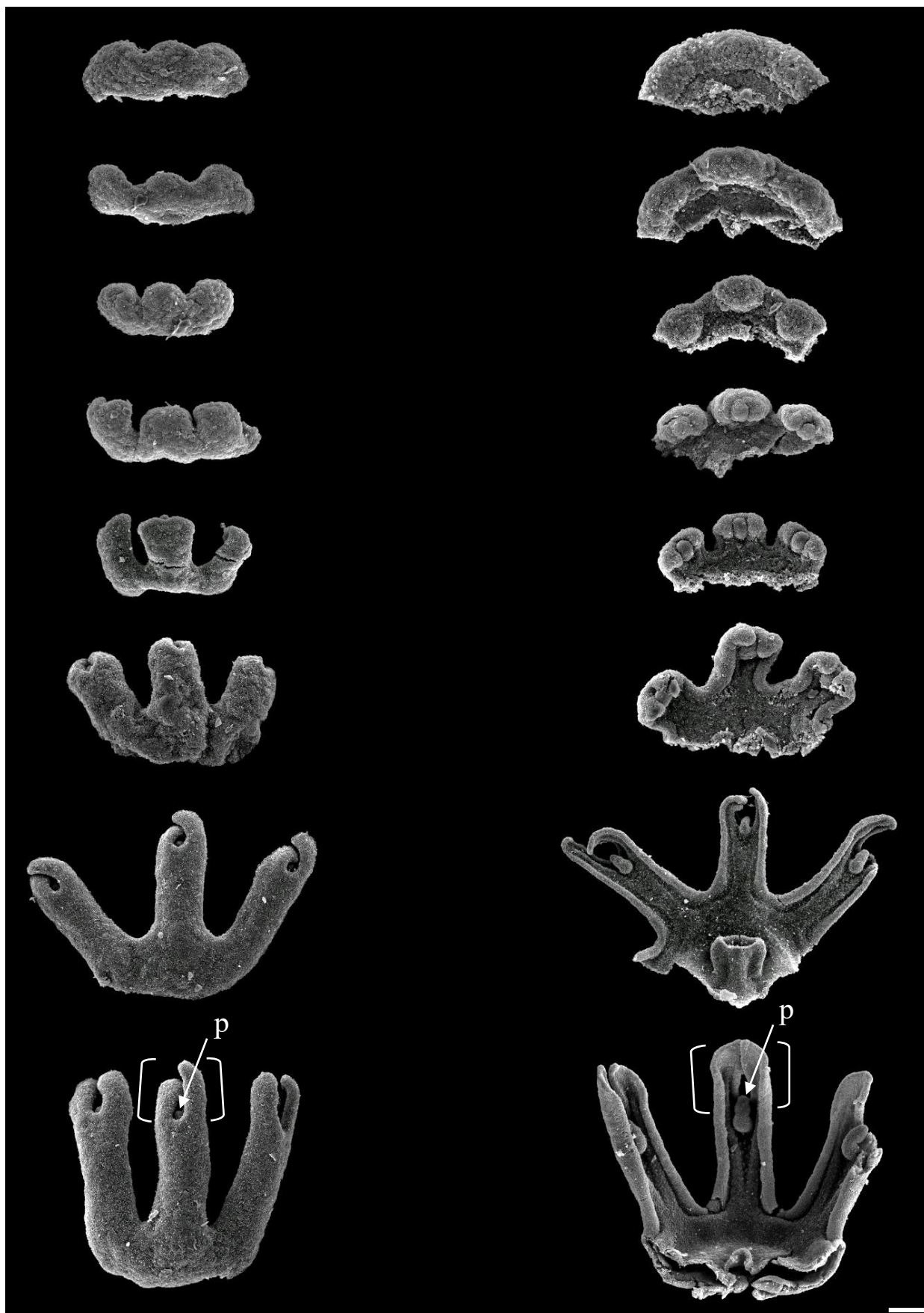


Рисунок 5. Развитие лопастей эфиры *Aurelia* sp., показаны фрагменты дисков стробил (по три лопасти) на последовательных стадиях развития (сверху вниз), слева – с эксумбреллярной (аборальной), справа – с субумбреллярной (оральной) стороны; р – ропалий, белыми скобками показаны раздвоенные лопасти эфиры, мо 100µm.

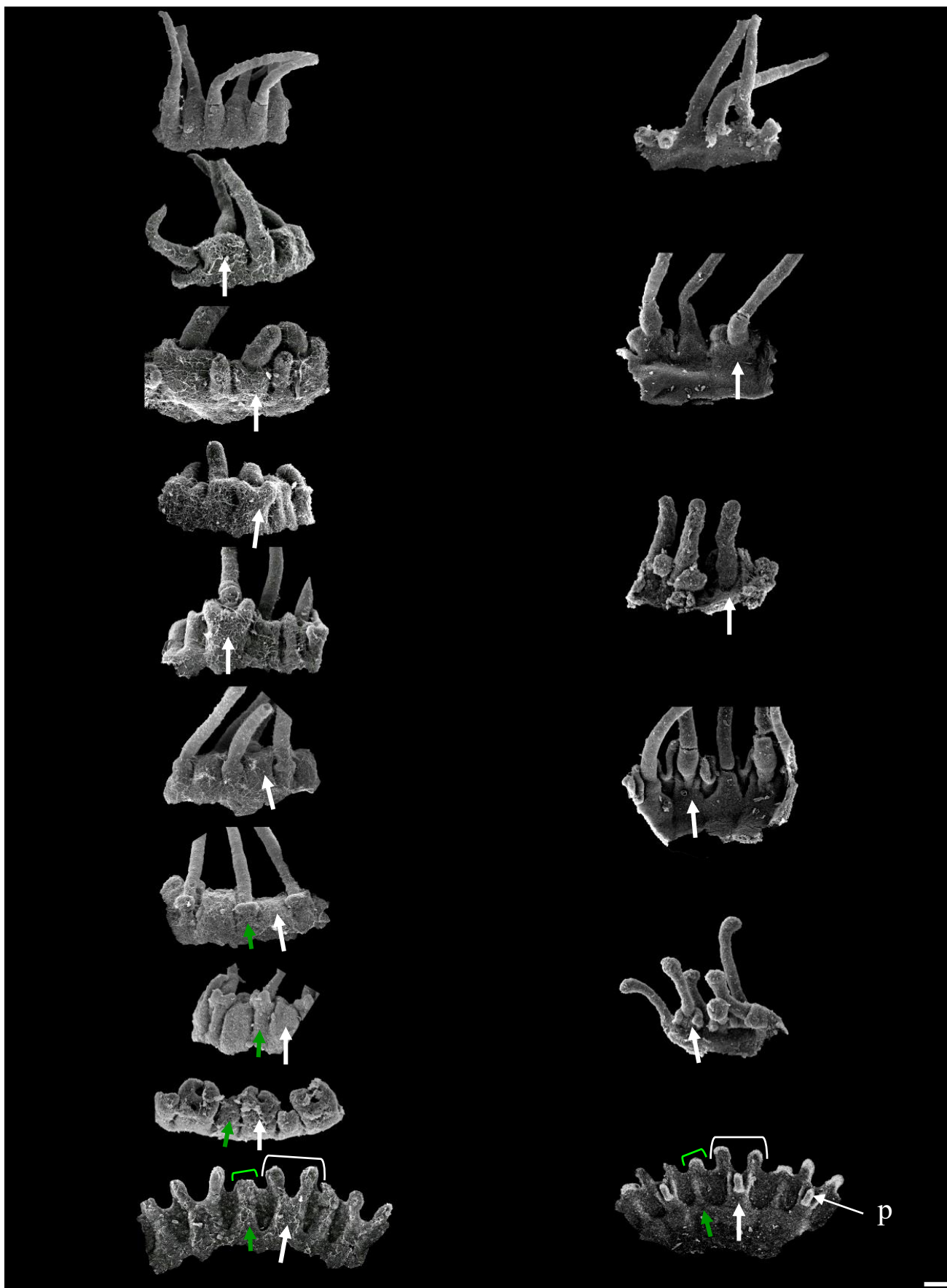


Рисунок 6. Развитие лопастей эфиры *Cassiopoera*, показаны фрагменты дисков (по три раздвоенные лопасти) стробил на последовательных стадиях развития (сверху вниз). слева – с эксумбреллярной (аборальной), справа – с субумбреллярной (оральной) стороны; р – ропалий, белыми стрелками и скобками показаны раздвоенные лопасти эфиры, зелеными – простые, мо 100μm.



Остальные щупальца либо полностью редуцируются в течение стробилиации (у *Aurelia*), либо участвуют в формировании простых (нераздвоенных) лопастей без ропалиев (у *Cassiopea*). Интересно, что простые лопасти *Cassiopea* изначально закладываются как раздвоенные, и только позже сменяют форму на простую (рис. 6).

Изменение размеров и пропорций диска будущей эфиры

Увеличение площади диска будущей эфиры происходит параллельно морфогенезу края диска стробилы во всех исследованных культурах.

У *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» зачатки эфир закладываются как плоские диски. Увеличение диаметров этих дисков идет равномерно, с небольшой асимметрией между лидирующей и отстающей сторонами. У *Cassiopea* чашечка, из которой будут формироваться эфира имеет колоколообразную форму. Во время метаморфоза этой чашечки увеличение площади будущей субумбреллы (оральный диск полипа) идет быстрее, чем увеличение площади будущей эксумбреллы. В результате эфиры *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» остаются плоскими во время всего их морфогенеза, а эфиры *Cassiopea* постепенно уплощаются. У *Aurelia* культуры «Беломорская» расширение эксумбреллы идет быстрее, чем расширение субумбреллы, при этом увеличение толщины мезоглеи и площади эксумбреллы происходит уже на стадии закладки перетяжки. В итоге, к моменту отделения от стробилы эфиры *Aurelia* культуры «Беломорская» приобретают объемную, колоколообразную форму.

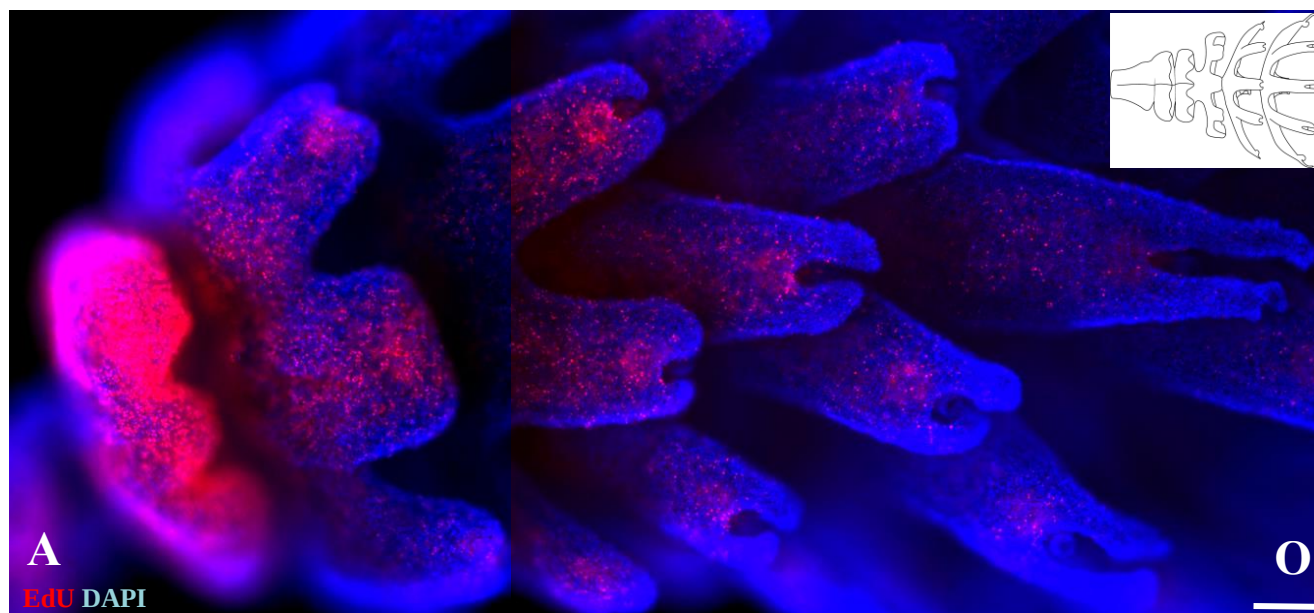


Рисунок 7. Синтез ДНК в стробиле *Aurelia* sp. с дисками разной степени развития. А – аборальный конец, О – оральный конец стробилы, мо 100µm.

Число делящихся клеток на единицу площади поверхности у зачатков эфир *Aurelia* по мере развития диска уменьшается (рис. 7). В то же время толщина эпидермы и гастродермы падает с 30-40 мкм до 15-20 мкм. У *Cassiopea* толщина эпидермы практически не меняется (менее 15 мкм), а толщина гастродермы уменьшается с 25-40 мкм до 15 мкм. Многорядные цилиндрические эпителии как у *Aurelia*, так и у *Cassiopea* постепенно приобретают однорядное строение. Следовательно, основной механизм увеличения диаметра диска стробилы заключается в радиальной интеркаляции (Keller et al., 2000): клетки двух и более рядов встраиваются друг между другом. Апико-базальные оси клеток сокращаются, а площади их апикальных и базальных поверхностей увеличиваются. Это приводит к росту площади поверхности будущей эфир.

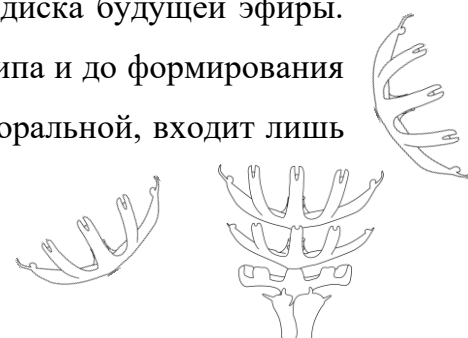
Морфогенез гастральной системы эфир

У *Aurelia* развитие центрального и 8 радиальных гастральных мешков происходит параллельно морфогенезу края диска будущей эфир. Веллярные мешки образуются позже, когда все остальные структуры эфир уже сформированы и она готова к отделению от стробилы или уже отделилась от неё. У эфир всех исследованных культур *Cassiopea* гастральная система значительно сложнее: имеется небольшой центральный гастральный мешок и от него отходит множество каналов. Подразделение гастральной системы на отделы, а затем и каналы появляется на ранних стадиях развития диска эфир, до его обособления от стробилы пертяжкой.

В центральном гастральном мешке эфир во время стробилиации формируются гастральные нити. Данные нашей работы подтверждают наличие гомологии между септами полипа и гастральными нитями эфир как у *Aurelia*, так и у *Cassiopea*. В обоих случаях формирование гастральных нитей происходит за счет выпячивания гастродермы центрального участка редуцирующейся септы в медиальном направлении.

Морфогенез мышечной и нервной систем

У *Aurelia* мышечная и нервная системы эфир начинают развиваться относительно поздно: на последних этапах морфогенеза края диска будущей эфир. У *Cassiopea* это происходит до полной редукции щупалец полипа и до формирования пертяжки. В состав зачатков всех эфир *Aurelia*, кроме самой оральной, входит лишь



незначительная часть мышечной и нервной системы полипа, представленная в основном фрагментами четырех септ полипа.

Во время стробилиляции септы полипа постепенно редуцируются, в том числе происходит редукция входящих в их состав мускульных и нервных тяжей. Судя по всему, эти тяжи не участвуют в построении структур тела эфиры. Это подтверждается и литературными данными: отсутствие септ у полипа (аномалия или результат удаления септ) никак не нарушает нормального развития мышечной и нервной систем эфир во время стробилиляции (Berking, Herrmann, 2002; Helm et al., 2015).

Отделение эфиры от стробилы

Перед отделением эфиры от стробилы, зона перетяжки состоит только из четырех истонченных мускульных тяжей, оставшихся от септ полипа. Эфира начинает ритмично пульсировать, сгибая лопасти к субумбрелле. Эта пульсация приводит к тому, что мускульные тяжи рвутся, высвобождая эфиру. В центре эксумбреллы эфиры остается характерное крестообразное отверстие, которое в ближайшие часы закрывается клетками эпидермы.

Регенерация полипа

Формирование щупалец у регенерирующего полипа происходит у всех исследованных культур с прохождением стадий с 4-8-16(-32) щупальцами. То есть восстановление щупалец после стробилиляции этапами похоже на их формирование во время развития полипа.

Отличительные черты трех вариантов стробилиляции

С точки зрения порядка ключевых событий и их макроморфологических деталей можно выделить три хорошо различимых варианта стробилиляции (рис. 1, 2).

1. Стробилиляция полипов *Aurelia* культур «Киль» и «Вена». Формируется, как правило, 5-6 эфир за 8-10 дней при температурной индукции 16°C (или за 2 дня при использовании 5-метокси-2-метилиндола при 16-24°C).
2. Стробилизация полипов *Aurelia* культуры «Беломорская». Формируется, как правило, 2-3 эфиры за 11-13 дней при 6-10°C;
3. Стробилизация трех культур *Cassiopea*. Формируется 1 эфира за 2-4 дня при 24-30°C.

Различия между стробилами разных культур *Aurelia*

Стробилы и эфиры *Aurelia* культур «Вена» и «Киль» полностью сходны друг с другом, несмотря на разное происхождение. Стробилы и эфиры культуры «Беломорская» от них отличаются по макроморфологическим признакам: размер и форма эфиры, форма гастральных мешков, число гастральных нитей при отделении эфиры от стробилы. Известно, что эти признаки используются при идентификации эфир симпатрических видов Scyphozoa (Dong et al., 2008; Straehler-Pohl, Jarms, 2010). Можно заключить, что культура «Беломорская» представляет собой один вид рода *Aurelia*, а культуры «Вена» и «Киль» – другой. Эту гипотезу недавно подтвердили наши коллеги с кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. По молекулярным данным, культура «Беломорская» представляет собой вид *A. aurita*, а культуры «Вена» и «Киль» – *A. coerulea* (И.А. Косевич, личное сообщение).

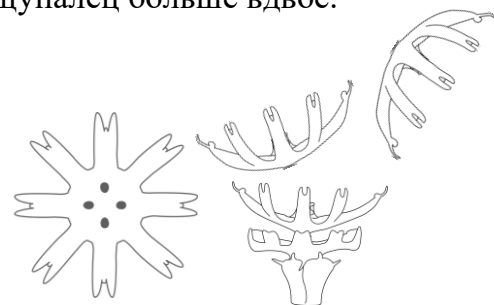
Интересно, что морфологические различия между культурами проявляются только в момент стробилиции, а на стадии полипа различия ограничиваются размерами особей. Это говорит о необходимости использования в систематике данных по всем стадиям сложного жизненного цикла.

Различия между стробилами разных культур *Cassiopea*

Различия между тремя культурами *Cassiopea*, имеющими разное происхождение, ограничиваются условиями индукции стробилиции и цветом стробил и эфир. Индуцирующие факторы могут зависеть от предшествовавших условий содержания. Цвет эфир зависит от наличия или отсутствия симбионтов, что в лабораторных культурах также зависит от условий содержания (Rahat, Adar, 1980; Hofmann, Kremer, 1981; Thornhill et al., 2006).

Различия между стробилами *Aurelia* и *Cassiopea*

Полипы, стробилы и эфиры исследованных представителей двух родов заметно отличаются друг от друга. Полипы *Cassiopea* в отличие от *Aurelia* имеют хорошо выраженный стебелёк, крупную чашечку (рис. 1а, 2а, 4а). Диаметр ротового диска *Cassiopea* больше, чем у *Aurelia* культур «Вена» и «Киль», содержащихся при той же температуре (1,4 мм против максимум 1,25 мм), а количество щупалец больше вдвое.



У *Aurelia* формируется эфيرا с 8-ю раздвоенными на концах лопастями, на каждой лопасти имеется по ропалию. У *Cassiopea* формируется эфيرا с 16-ю раздвоенными лопастями (по ропалию на каждой) и 16-ю простыми лопастями (без ропалиев). Можно предположить, что различия в числе лопастей эфир *Aurelia* и *Cassiopea* связаны именно с различиями в строении их полипов. Политературным данным, в двух других родах, где число щупалец в среднем достигает 32, *Phacellophora* и *Sanderia* (Semaestomeae), также формируются эфиры с 16-ю раздвоенными лопастями (Uchida, Sugiura, 1978; Straehler-Pohl et al., 2011). Известно, что после отделения восьмилопастных эфир Semaestomeae и Rhizostomeae от стробилы, между их раздвоенными лопастями появляются простые или раздвоенные лопасти второго порядка без ропалиев (Calder, 1973; Kawahara et al., 2006; Holst et al., 2007; Schiariti et al., 2008; Fuentes et al., 2011 и др.). Их положение указывает на возможную гомологию между этими лопастями и адрадиальными раздвоенными лопастями *Cassiopea*. Можно предположить наличие гетерохронии: более ранней закладки лопастей второго порядка у эфир *Cassiopea* по сравнению с другими родами Scyphozoa. Однако стоит отметить, что на этих лопастях у *Cassiopea* есть ропалии. Также у *Cassiopea* имеются 16 простых лопастей без ропалиев – уникальный признак рода. Судя по всему, морфогенез края диска эфир во время и после стробилизации обладает значительной эволюционной пластичностью.

В процессе стробилизации закладка раздвоенных лопастей и начало морфогенеза раздвоенного кончика лопасти у *Cassiopea* происходит раньше, чем у *Aurelia*. Данная гетерохрония закладки кончиков лопастей обусловлена разной формой лопастей эфир: если у *Aurelia* раздвоенный кончик занимает только 1/2 - 1/3 длины всей лопасти, то у *Cassiopea* – полную длину лопасти (рис. 5, 6).

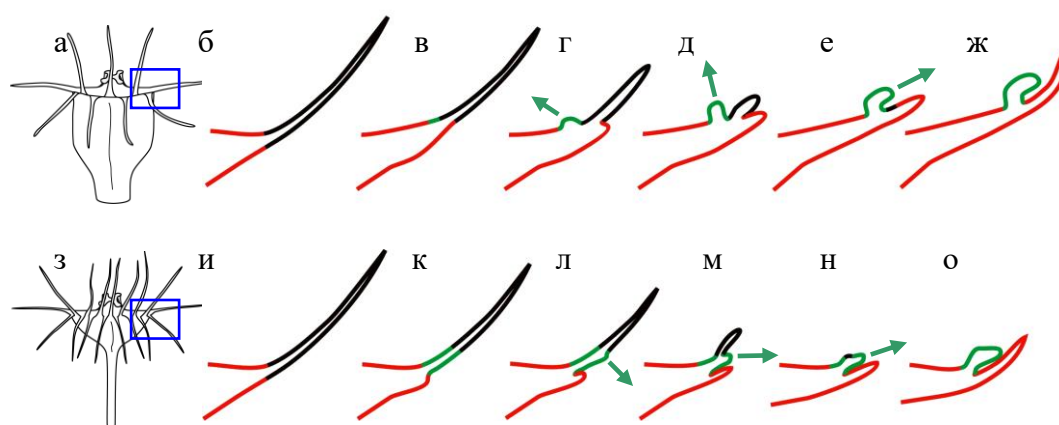


Рисунок 8.
Последовательные
стадии
формирования
ропалиев во время
стробилизации
Aurelia (а-ж) и
Cassiopea (з-о).

а, з – схематическое изображение полипов *Aurelia* и *Cassiopea*, рамками показаны участки, изображенные на б-ж и и-о, соответственно. б-ж, и-о – схематическое изображение среза края ротового диска полипа. Для наглядности, раздвоенный кончик лопасти расположен в одной плоскости с ропалием. Чёрным показано редуцирующееся щупальце полипа, красным показана формирующаяся лопасть эфиры, зелёным показан формирующийся ропалий эфиры. Зелёными стрелками показано направление роста кончика ропалия.

Положение ропалия относительно щупальца полипа различается у *Cassiopea* и *Aurelia*. Особенно интересно, что у *Cassiopea* зачаток ропалия формируется в латеральном направлении от щупальца, а у *Aurelia* – в медиальном направлении (рис. 8). Чем обусловлены данные различия в морфогенезе сходных по строению структур, остается неясным.

Мышечная и гастральная системы эфиры *Cassiopea* по сравнению с эфирой *Aurelia* устроены сложнее и начинают развиваться во время стробилиации раньше. Так, велярные гастральные мешки у *Aurelia* появляются только на самых последних стадиях стробилиации, перед отделением эфиры. А у *Cassiopea* многочисленные гастральные каналы формируются ещё до замыкания перетяжки и завершения морфогенеза лопастей эфиры. Характерный для взрослой медузы *Cassiopea* разветвленный манубриум начинает формироваться уже во время стробилиации.

В результате стробилиации у *Aurelia* формируются эфиры, сильно отличающиеся от взрослой медузы по строению, форме и поведению. У *Cassiopea* в результате стробилиации формируется одна, но хорошо развитая эфира. Эта эфира демонстрирует значительное сходство со взрослой медузой по форме и строению. В отличие от эфир *Aurelia*, эфира *Cassiopea* сразу после отделения от стробилы способна питаться и удерживаться в толще воды при отсутствии течения. Можно сделать предположение, что *Cassiopea*, в отличие от многих других Rhizostomeae и Semaestomeae, демонстрирует своего рода прямое развитие во время стробилиации.

Выводы

1. Стробилиация всех изученных сцифоидов состоит из стандартного набора событий: индукции стробилиации; подготовки тканей полипа к метаморфозу; обособления диска будущей эфиры; морфогенеза края диска будущей эфиры; изменения размеров и пропорций диска будущей эфиры; морфогенеза гастральной системы эфиры; морфогенеза мышечной и нервной систем эфиры; формирования манубриума эфиры; отделения эфиры от стробилы; регенерации полипа.



2. Клеточные и тканевые основы морфогенезов одинаковы у вида с полидискоидной и у вида с монодискоидной формами стробилиции. Пролиферация клеток принимает участие в подготовке тканей к метаморфозу, формировании ропалиев и гастральных нитей. Сочетание активных (эвагинация гастродермы) и пассивных (изгиб эпидермы) механизмов изгибания эпителиев обеспечивает обособление диска эфиры от стробилы. Радиальная и планарная интеркаляция участвуют в быстром изменении формы диска будущей эфиры.

3. Часть органов медузы гомологична органам полипа и формируется на их основе. Ропалии оральной эфиры развиваются из интеррадиальных и перрадиальных щупалец полипа. Лопasti эфиры развиваются из оснований интеррадиальных и перрадиальных щупалец полипа. Манубриум оральной эфиры наследуется от материнского полипа. Гастральные нити всех эфир развиваются на основе септ полипа.

4. В морфогенезе эфир *Aurelia* и *Cassiopea* наблюдается ряд гетерохроний, связанных с формированием признаков эфир: формирование перетяжки и регенерация полипа у *Aurelia* происходит относительно раньше, чем у *Cassiopea*; морфогенез лопастей, ропалиев, манубриума, гастральной системы и мышечной системы эфиры у *Cassiopea* происходит относительно раньше, чем у *Aurelia*.

5. Отделившаяся от стробилы эфира *Cassiopea* ближе по строению к молодой неполовозрелой медузе, чем к личинке – эфире, свойственной другим изученным представителям отрядов Rhizostomeae и Semaestomeae. Таким образом, для медузы *Cassiopea* характерно прямое развитие.

6. Анализ собственных и литературных данных показал, что постадийная закладка щупалец полипа (2-4-8-16-32) во время метаморфоза, регенерации и бесполого размножения может обеспечиваться подавлением закладки щупалец вблизи уже имеющихся. Щупальца полипа имеют разную судьбу, выявляющуюся в ходе стробилиции: они подразделены на ропалиевые и неропалиевые. Это подразделение ассоциировано с положением оснований щупалец и экспрессией в них гена-маркёра *bmp 5/8*. Оно постоянно у завершившего развитие полипа, но может меняться на разных стадиях закладки щупалец.

7. Экспериментально подтверждена закономерность, выявленная в ходе анализа литературных данных: из комплекса средовых факторов, индуцирующих стробиляцию, важнейшим и наиболее универсальным является продолжительное изменение температуры среды обитания.

8. Показан высокий уровень пластичности механизмов регуляции стробиляции у *Aurelia*: чувствительность сцифополипов по отношению к сигнальным факторам зависит от истории содержания культуры в большей степени, чем от её географического происхождения.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, RSCI, в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.07 по специальности 03.02.04. – зоология

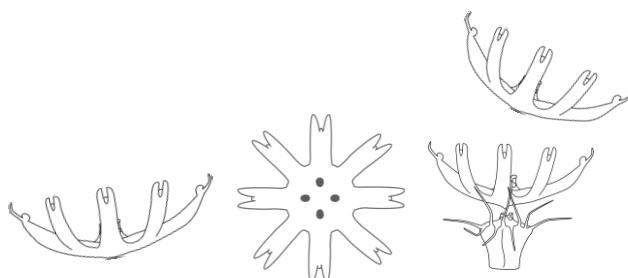
1. Сухопутова А. В., Краус Ю. А. Факторы среды, индуцирующие переход между жизненными формами полипа и медузы у *Aurelia aurita* (Scyphozoa) // Онтогенез. 2017. Т. 48. №. 2. С. 122-133. DOI: 10.7868/S0475145017020070. Импакт-фактор (РИНЦ): 0,882.

2. Сухопутова А. В., Краус Ю. А. Пластичность реакции полипов *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) на сигнальный фактор, регулирующий их жизненный цикл // Зоологический журнал. 2017. Т. 96. №. 11. С. 1309-1318. DOI: 10.7868/S0044513417090161. Импакт-фактор (РИНЦ): 0,468.

3. Сухопутова А. В. и др. Дифференцировка орально-аборальной оси и основных морфологических структур тела в жизненном цикле Scyphozoa // Журнал общей биологии. 2018. Т. 79. №. 5. С. 342-362. DOI: 10.1134/S0044459618050093. Импакт-фактор (РИНЦ): 0,682.

Тезисы докладов на конференциях и статьи в сборниках

1. Сухопутова А. В., Краус Ю. А. Клеточные основы морфогенетических процессов, обеспечивающих стробиляцию Scyphozoa // Зоология беспозвоночных: новый век. Москва. 2018. С. 118.



2. Naimark E. B., Sukhoputova A. V. Persisting of the jellyfish morphology in the actualistic experiment // Abstract volume International Symposium on the Ediacaran-Cambian Transition 2017. Canada. 2017. P. 85.
3. Nefedova E., Sukhoputova A. V. The importance of conditions for the study of marine invertebrates in culture // ICIM 4 Programm & Abstracts. Moscow. 2017. P. 231.
4. Sukhoputova A. V., Kraus Y. A. Three forms of strobilation in scyphozoan polyps: Key stages and morphogenesis // ICIM 4 Programm & Abstracts. Moscow. 2017. P. 302.
5. Sukhoputova A. V., Kraus Y. A. Comparison of medusa formation in two scyphozoan species // Euro Evo Devo abstracts 2016. Uppsala, Sweden. 2016. P. 287.
6. Sukhoputova A., Kraus Y. A. Polyp-to-medusa transition as a model for studying the life cycle evolution // 6th Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology (Uppsala, Sweden 26-29 July 2016). Abstracts. Uppsala, Sweden. 2016. P. 287.
7. СухопUTOва А. В., Краус Ю. А. Как формируются медузы: монодискная и полидискная стробилиция на примере *Cassiopea* и *Aurelia* // Школа для молодых специалистов и студентов Современные проблемы эволюционной морфологии животных к 110-летию со дня рождения академика А.В. Иванова. ЗИН РАН Санкт-Петербург. 2016. С. 67–68.
8. СухопUTOва А. В. Исследование бесполого размножения у полипов сцифомедуз // Материалы XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов. Москва. 2015. С. 159.
9. СухопUTOва А. В. Гистологическое исследование стробилиции полипа сцифомедузы // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2014. Москва. 2014. С. 15.
10. Sukhoputova A., Kraus Y. How does the polyp transform into medusae: Morphogenetic basis of strobilation in *Aurelia* // Unravelling the Developmental Regulatory Network in Early Animals. — Tutzing, Germany. 2013. P. 109.

