

УДК 575.86: 591.341.2: 592

ЗОЛОТОЙ ВЕК СРАВНИТЕЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ: ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ И НЕЙРОГЕНЕЗ ТРОХОФОРНЫХ ЖИВОТНЫХ¹

© 2010 г. Л. П. Незлин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: nezlinl@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.10 г.

Окончательный вариант получен 25.03.10 г.

У метамерных аннелид, рекапитулирующих в онтогенезе анцестральное олигомерное состояние, ортогон есть дериват диффузного плексуса.

*Студенческий фольклор
биологического факультета МГУ*

Применение методов иммунохимического маркирования нейрональных элементов и лазерной конфокальной микроскопии значительно расширило возможности сравнительной морфологии и позволило нам проследить нейрогенез различных трохофорных животных на уровне отдельных идентифицированных нейронов и их проекций. Оказалось, что многие из общепринятых представлений о нервной системе личинок и построенные на этой основе филогенетические теории не соответствуют действительности. Сравнительный анализ показывает, что ортогональный мозг у репрезентативных представителей группы Lophotrochozoa отсутствует на всех стадиях развития. У трохофор, принадлежащих к разным таксономическим группам внутри Lophotrochozoa, обнаружены принципиальные отличия в строении и развитии нервной системы, которые свидетельствуют о том, что личинки-трохофоры в этих группах не гомологичны, а сходство между ними обусловлено, вероятнее всего, конвергенцией. Наши результаты ставят под сомнение идею трохофоры как анцестральной формы, общей для трохофорных животных. Необходимо исключить из филогенетических дискуссий ортогон как базовый план строения нервной системы и трохофору как анцестральную форму, общую для Lophotrochozoa.

Ключевые слова: трохофора, нейрогенез, ортогон, моллюски, полихеты, филогения.

Одной из главных задач зоологии, да и биологии вообще является построение естественной системы животного мира, т.е. такой системы, в которой взаимное расположение таксонов определяется их филогенетическим родством. И у тех, кто изучает беспозвоночных животных, здесь возникают большие проблемы, поскольку ископаемые останки, соответствующие основным современным типам строения животных, появляются во время “кембрийского взрыва жизни” практически одновременно, и никаких переходных форм в докембрии не обнаруживается (Макменамин, 1987).

Современная филогения беспозвоночных строится на основании комплекса сравнительно-морфологических и генетических признаков. При этом выделяются три основные группы билатерально симметричных животных: Lophotrochozoa, Deuterostomia и Ecdysozoa (Field et al., 1988; Halanych et al.,

1995; Kim et al., 1996; Aguinaldo et al., 1997; Peterson et al., 2000; Tessmar-Raible, Arendt, 2003). Термин “Lophotrochozoa” (Halanych et al., 1995), что означает “животные с венчиком щупалец и личинкой трохофорой”, в настоящее время объединяет щупальцевых (Lophophorata) и трохофорных (Trochozoa) животных.

Lophophorata объединены по наличию лофофора – венчика щупалец вокруг рта – и включают в себя группы Bryozoa, Entoprocta, Phoronida и Brachiopoda. Следует отметить, что в отличие от Trochozoa, которые имеют спиральное дробление, Lophophorata обладают классическим радиальным дроблением, поэтому ранее считались вторичноротыми (Deuterostomia); они были перемещены в первичноротые (Protostomia) лишь на основании изучения рибосомальной РНК (18S rRNA) (Peterson, Eernisse, 2001; Mallatt, Winchell, 2002).

Trochozoa – это группа таксонов, в которых присутствует личинка трохофора (от греческ. *trochos* – колесо; *phora* – несущий). Так Гатчек (Hatscheck,

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 09-04-01326, 06-04-49401).

1878) назвал личинку полихеты *Polygordius*, имеющую апикальный султанчик и два пояска локомоторных ресничек вдоль экватора. Он же создал трохофорную теорию (Hatschek, 1888), предположив, что трохофора рекапитулирует общего предка первичноротых животных.

В настоящее время в Trochozoa включают следующие группы: Nemetea, Mollusca, Sipuncula, Echiura, Pogonophora и Annelida. Сюда же иногда причисляют плоских червей (Platyhelminthes) и коловраток (Rotifera). При этом немертины, например, не имеют в своем развитии ничего похожего на трохофору, а развиваются через личинку-пидидия или через атрохную лецитотрофную личинку. Однако Маслакова с соавторами (Maslakova et al., 2004) считают, что у последних имеются рудиментарные трохобласты, а значит, и скрытый прототрох (что представляется нам весьма сомнительным). План строения и развитие погонофор, плоских червей и коловраток отличаются еще сильнее. Типы личинок и их развитие в разных таксонах этой группы подробно описаны в обзорах Нильсена (Nielsen, 2004, 2005).

Зададимся вопросом: почему среди множества разных типов развития, встречающихся в группе Lophotrochozoa (мюллеровская личинка плоских червей, пидидий немертин, актинотроха форонид, цифонаут мшанок и т.д.), именем личинки трохофоры назван огромный надтиповой таксон? Иными словами, что есть такого в этой маленькой, просто устроенной личинке, что делает ее настолько важной, чтобы назвать ее именем чуть ли не целое царство животных?

Для ответа на этот вопрос обратимся к плану строения нервной системы у беспозвоночных животных. Общепринято, что у многоклеточных животных нервная система является наиболее филогенетически консервативной системой органов и ее организация значительно меньше подвержена изменениям, нежели структуры, которые она иннервирует, — это делает нервную систему важной для понимания филогенетических взаимоотношений (см., например: Child, 1921; Hanström, 1928; Bullock, Horridge, 1965; Kuhlenbeck, 1967; Hessling, Purschke, 2000; Hessling, Westheide, 2002; Nezhlin, Yushin, 2004).

Если мы рассмотрим план строения нервной системы в базовых группах беспозвоночных, то увидим, что вывести одну систему из другой чаще всего невозможно, поскольку отсутствуют промежуточные формы. Так, кишечнополостные имеют диффузный нервный плексус в эпителии стенки, плоские черви — мозговой ганглий в передней части тела и отходящие от него вперед и назад нервные стволы, соединенные более или менее упорядоченными поперечными комиссурами. А нервная система более сложно организованных животных (немертины, моллюски, аннелиды и т.д.) состоит из нервных стволов и разного количества ганглиев, соединенных комиссурами и коннективами (Bullock, Ho-

ridge, 1965). Как же связать между собой диффузный плексус, стволы с комиссурами и систему ганглиев?

Именно это и сделала маленькая трохофора!

В 1901 г. российский зоолог Мейер, работая на Неаполитанской биологической станции, опубликовал статью (Meyer, 1901), в которой подробно описал нервную систему трохофоры морской полихеты *Lopadorhynchus* (Annelida, Polychaete, Phyllodocidae). Результат его исследования был поистине сенсационным. По словам Окессона (Åkesson, 1967), Мейер детально описал хорошо развитую и сложно организованную ортогональную нервную систему. Описание иллюстрировано серией великолепных рисунков, некоторые из которых знакомы большинству зоологов по книгам и учебникам.

Мейер (Meyer, 1901) описал в составе нервной системы трохофоры экваториальное кольцо под прототрохом и три кольца в верхнем полушарии, соединенные семью парами меридиональных нервов. В нижнее полушарие проходят три парных нерва и один непарный, которые соединяются поперечными комиссурами. На нижнем конце все нервы сливаются в общее циркумблостополярное сплетение (рис. 1, а, б).

Окессон (Åkesson, 1967) писал, что многие зоологи нашли здесь то, что искали, — связь между сегментированными группами беспозвоночных и несегментированными беспозвоночными типа плоских червей. В большинстве классических руководств и учебников (см, например: Bütschli, 1921; Hanström, 1928; Dawydoff, 1959; Bullock, Horridge, 1965) личиночная нервная система полихет по Мейеру сравнивается с ортогональной нервной системой турбеллярий" (Åkesson, 1967). Мы можем добавить к этому списку и знаменитую книгу Беклемишева "Основы сравнительной анатомии беспозвоночных" (1964), в которой "протрохофора" с ортогональной нервной системой, произошедшая из радиально симметричного прототипа первичноротых животных, названа общим предком всех трохофорных животных.

Любопытно, что сам термин "ортогон" был впервые предложен значительно позже Райзингером (Reisinger, 1925) для плана строения нервной системы плоских червей при описании нервной системы турбеллярии. Ортогональная нервная система по Райзингеру состоит из набора взаимоперпендикулярных меридиональных стволов и поперечных комиссур, нейроны при этом концентрируются вдоль стволов, а также в местах пересечений стволов и комиссур. В 1931 г. Райзингер также предположил тождество планов строения нервного аппарата трохофоры и турбеллярии (цит. по: Reisinger, 1972).

Необходимо, однако, заметить, что задолго до Мейера Кляйненберг (Kleinenberg, 1886) детально изучил развитие трохофоры той же самой полихеты *Lopadorhynchus*. При этом он подробно описал ее нервную систему и его описание никак не соответствовало ортогону. Кляйненберг описывал нерв в основании прототроха и три связанных с ним группы

нейронов (дорсальную и две вентролатеральных), шесть крупных мультиполярных нейронов в передней полусфере, соединенных кольцевым и двумя латеральными нервами, а также медиодорсальный нерв в задней полусфере, который ветвится и охватывает анус. Может быть потому, что нервная система трохифоры *Lopadorhynchus* по Кляйненбергу никак не соответствовала концепции ортогональной нервной системы, после открытия Мейера об описании Кляйненберга предпочитали не вспоминать, хотя другие части его классической работы по развитию и метаморфозу полихеты впоследствии многократно цитировались.

Вскоре после работы Мейера Вольтерек (Wolteresk, 1904) опубликовал еще одно описание ортогональной нервной системы у трохифоры полихеты из рода *Polygordius*. По Вольтереку, нервная система состояла из восьми меридиональных стволов и кольцевого нерва прототроха в верхней полусфере и только двух продольных стволов и одной незамкнутой кольцевой комиссуры в нижней полусфере. Различие в числе меридиональных стволов (семь у *Lopadorhynchus* — по Мейеру и восемь у *Polygordius* — по Вольтереку) позволило Беклемишеву (1964) предположить, что здесь мы имеем дело с еще не установившейся симметрией нервного сплетения, как у более примитивных бескишечных турбеллярий, — еще одно свидетельство гомологии ортогонов плоских червей и аннелид.

Бючли (Bütschli, 1921) скопировал схему ортогональной нервной системы из работы Мейера, причем, написав об этом, он тем не менее ее несколько изменил, нарисовав вид сбоку (в оригинальной работе Мейера были даны только виды с дорсальной и вентральной сторон) и сделав решетку более упорядоченной (рис. 1, в). Схему Бючли затем скопировал Ханстрем (Hanström, 1928), а у Ханстрема ее заимствовали Буллок и Хорридж (Bullock, Horridge, 1965). Наиболее сильно изменил эту схему Давыдов (Dawydoff, 1959) (рис. 1, г), однако и он утверждал, что это схема “по Мейеру”. Давыдов явно пытался совместить в одно целое ортогон по Мейеру, ортогон по Вольтереку и схему Кляйненберга (рис. 1, д), не нашедшего у трохифоры *Lopadorhynchus* ортогона.

Схема Мейера–Бючли понравилась всем, поскольку она все поставила на свои места. Зоологи действительно нашли то, что давно искали, — доказательство трохифорной теории Гатчека (Hatscheck, 1888), согласно которой трохифора рекапитулирует организацию общего предка первичноротых животных (гипотетического трохозоона). Ортогон является производным диффузного плексуса кишечнополостных, а ганглионарная нервная система произошла из ортогона путем централизации, олигомеризации, цефализации и редукции решетки ортогона (Беклемишев, 1964; Reisinger, 1925, 1972; Hanström, 1928).

До сегодняшнего дня в большинстве книг по эволюции нервной системы беспозвоночных можно

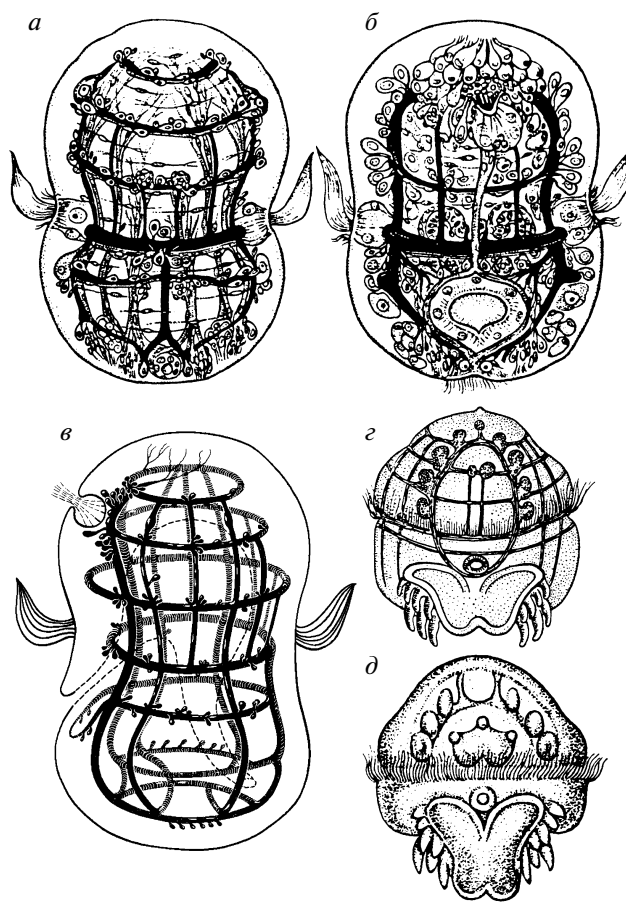


Рис. 1. Схемы строения нервной системы трохифоры *Lopadorhynchus* разных авторов: а, б — Мейера (Meyer, 1901), вид с дорсальной (а) и вентральной (б) сторон; в — Бючли (Bütschli, 1921), латеральный вид; г — Давыдова (Dawydoff, 1959); д — Кляйненберга (Kleinenberg, 1886) — самая первая схема нервной системы.

прочитать, что нервная система моллюсков и полихет является производным ортогона (см., например: Schmidt-Rhaesa, 2007). Справедливости ради отметим, что не все авторы с этим согласны. Так, Сотников с соавторами (1994) писали, что личинки полихет не обладают классическим ортогоном, а их нервные решетки не гомологичны ортогону турбеллярий. Нильсен (Nielsen, 2001) отмечал, что в действительности типичный ортогон можно найти лишь у нескольких плоских червей, а его существование у аннелид и моллюсков проблематично (“is in the eye of the beholder”). Тем не менее, практически все авторы сходятся в том, что трохифора является анцестральной формой, общей для Lophotrochozoa (или Protostomia, или Spiralia).

Мы подробно остановились на истории вопроса об ортогоне, чтобы читателю стало понятно, что теория протрохофоры и ортогона как изначального плана строения (Bauplan) нервной системы трохифорных животных строится в основном на описанном в работах Мейера (Meyer, 1901) и Вольтерека

(Woltereck, 1904) ортогоне у трохофор полихет *Lopadorhynchus* и *Polygordius*, поскольку более никто никаких следов ортогона в группе Lophotrochozoa не обнаруживал, хотя его периодически искали.

Окессон (Åkesson, 1967) в поисках ортогона тщательно изучил нервную систему трохофор *Lopadorhynchus* и *Polygordius*, ортогона не нашел и написал, что ортогон у *Polygordius* представляется таким же сомнительным, как и у *Lopadorhynchus*. Также не нашли ортогона в развитии полихет Бубко с соавторами (1979), Ушакова и Евдонин (1987) и ряд других авторов, изучавших архитектуру нервной системы по локализации холинэстеразной активности. Лакалли (Lakalli, 1984) опубликовал детальное описание нервной системы трохофоры полихеты *Spirobranchus* (Serpulidae) по серийным ультратонким срезам и ортогона тоже не нашел. Хай-Шмидт (Hay-Schmidt, 1995) на основании иммуноцитохимических исследований личинок *P. lacteus* описал высокоцентрализованную нервную систему, состоящую из апикального ганглия, латеральных нервов и вентрального ганглия.

Так есть ли ортогон у трохофор? Есть ли вообще что-нибудь похожее на ортогон в группе Lophotrochozoa? Почему в течение 100 лет остается нерешенным вопрос о плане строения нервной системы трохофоры, которую можно поймать в планктоне в любой части света и которая уже более века занимает без преувеличения центральное положение в филогенетической системе беспозвоночных животных?

Ранее главными проблемами, которые препятствовали изучению нервной системы трохофор, были, во-первых, их размеры. Тело диаметром 150–250 мкм слишком мало для классической световой гистологии. Во-вторых, до недавнего времени отсутствовали специфические маркеры на элементы нервной системы, что, конечно же, ограничивало возможности зоологов, зато давало простор для фантазии. В-третьих, толщина многих нервов в теле трохофоры меньше разрешающей способности оптического микроскопа (0.2–0.3 мкм), поэтому их можно увидеть только с помощью электронного микроскопа, но и это практически невозможно, так как необходимо сделать 2–3 тыс. серийных срезов на трохофору. Мало кто смог бы, как Лакалли, посвятить три года жизни изнурительной серийной резке нескольких трохофор на ультрамикротоме.

Однако в конце XX в. ситуация кардинально изменилась — наступил, без преувеличения, золотой век сравнительной морфологии. В обиход зоологов вошли флуоресцентная гистология и иммуноцитохимия, которые позволили, во-первых, избирательно и достоверно маркировать элементы нервной системы на тотальных препаратах, а во-вторых, видеть в световом микроскопе даже те структуры, размеры которых значительно меньше оптической разрешающей способности микроскопа. Появление конфокальных лазерных сканирующих микроскопов позволило не только видеть все интересующие нас структуры на тотальных препаратах, но и сохра-

нять их объемные изображения для последующего анализа (см., например: Мухитов и др., 2010; Hibbs, 2004; Handbook ..., 2006).

Сейчас мы можем легко и просто изучать на клеточном и субклеточном уровнях строение и развитие самых разных органов и тканей на тотальных препаратах, включая, разумеется, нервную систему. В нашем распоряжении имеются высокочувствительные и специфичные маркеры как на структурные компоненты нервных клеток и их отростков, так и на химически специфичные элементы нервной системы — нейромедиаторы и ферменты их синтеза. К тому же сейчас мы имеем в своем арсенале очень яркие флуоресцентные метки, которые многократно увеличивают чувствительность и разрешающую способность микроскопии и позволяют видеть даже одиночные отростки нейронов, толщина которых значительно меньше оптической разрешающей способности микроскопа.

Мы воспользовались возможностями, которые дают современные лазерные конфокальные микроскопы в сочетании с флуоресцентной иммуноцитохимией, и изучили развитие нервной системы у трохофор нескольких репрезентативных видов полихет и моллюсков: *Phyllodoce maculata* (Polychaeta, Phyllocodidae), *Platynereis dumerilii* (Polychaeta, Nereida), *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca, Polyplacophora), *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia).

Выбор объектов исследования определялся следующими соображениями. Семейство Phyllocodidae, куда входит род *Phyllodoce*, является центральным в одном из самых примитивных отрядов полихет Phyllocodida, поэтому мы считаем его высоко репрезентативным в плане проявления анцестральных черт развития. *Platynereis* — это представитель огромного семейства Nereididae, которое можно назвать “типичными” полихетами из учебника. Хитоны, к которым принадлежит *I. hakodadensis*, — это одни из наиболее примитивных моллюсков. Они во многом схожи с аннелидами, в первую очередь по строению дефинитивной нервной системы, которая у хитонов очень похожа на нервную систему полихет (Bullock, Horridge, 1965). Двустворчатые моллюски, представителем которых является мидия, — это второй по величине класс моллюсков, однако о развитии их нервной системы известно очень мало. Тем не менее считается, что нервная система трохофоры мидии соответствует метатрохофоре аннелид (Nielsen, 2001).

Кроме того, для всех этих видов можно получить лабораторную культуру развивающихся личинок и содержать ее вплоть до метаморфоза и формирования дефинитивной нервной системы, что совершенно необходимо при изучении нейрогенеза.

Работа представляет собой обзор опубликованных ранее наших и литературных данных, которые, на наш взгляд, позволяют ответить на два важных вопроса: есть ли у Trochozoa ортогон и является ли для них трохофора анцестральной формой?

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работу проводили на лабораторных культурах развивающихся эмбрионов вышеперечисленных видов полихет и моллюсков. Для выявления нервной системы использовали коммерческие антитела против ацетилированного α -тубулина, которые маркируют нейротубулы — специфический компонент цитоскелета нейронов, и против нейромедиаторов серотонина (5-hydroxytryptamine, 5-HT) и FMRFa-амида (FMRFa), поскольку ранее было показано, что именно эта комбинация антител адекватно маркирует нейрональные элементы в личиночном развитии трохофорных животных, включая самые ранние нейроны (Croll, Voronezhskaya, 1996; Croll, 2000). Для визуализации нейрональных элементов использовали коммерческие флуоресцентные маркеры “Molecular Probes”, США) и лазерные сканирующие конфокальные микроскопы Zeiss LSM510, Leica TCS SP1, SP5 и SPE, Германия. Подробные описания получения и содержания лабораторных культур развивающихся личинок, характеристики антител, методики иммуномечения и обработки результатов приведены в соответствующих публикациях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейрогенез полихеты *Ph. maculata* начинается с одиночного периферического 5-HT иммунореактивного нейрона (5-HT-нейрона) на заднем конце тела (Voronezhskaya et al., 2003). Два базальных отростка этого нейрона идут вперед по вентральной стороне тела и, дойдя до прототроха, ветвятся и маркируют нерв прототроха (рис. 2, а). Затем прямо позади прототроха появляются 5-HT-нейроны: пара на дорсальной стороне тела и один — в апикальном сенсорном органе (рис. 2, б). Позже на стадии развитой трохофоры появляются еще 5-HT-нейроны в апикальном органе и нейроны вокруг ротового отверстия (рис. 2, в).

Одновременно с первым 5-HT-нейроном в апикальном органе появляется первый FMRFa-иммунореактивный нейрон (FMRFa-нейрон), отростки которого, однако, не выходят за пределы апикального органа (рис. 2, г). Затем на вентральной стороне появляется одиночный FMRFa-нейрон и увеличивается число FMRFa-нейронов в апикальном органе (рис. 2, г). У развитой трохофоры к ним добавляются еще два FMRFa-нейрона на заднем конце тела (рис. 2, е).

Иммунореакция против тубулина показала, что других нервных стволов или комиссур, кроме вышеперечисленных, в теле трохофоры филлодоце нет. Таким образом, у развитой трохофоры нервная система включает в себя нерв прототроха, два вентролатеральных ствола и околоротовое кольцо в нижней полусфере, а также апикальный орган и шесть меридиональных нервов в верхней полусфере. Подробнее о развитии нервной системы *Ph. maculata* описано ранее (Voronezhskaya et al., 2003).

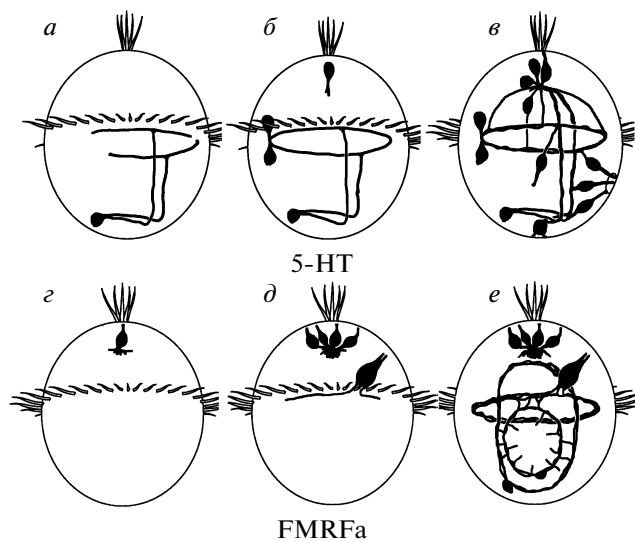


Рис. 2. Схема развития нервной системы трохофоры полихеты *Ph. maculata* (Phyllodocidae); иммунореакция против серотонина, вид с латеральной стороны (а–в) и FMRFa, вид с вентральной стороны (г–е) (по: Voronezhskaya et al., 2003, с модификациями). Трохофора: а, г — ранняя (48 ч с начала развития), б, д — развитая (52 ч), в, е — поздняя (60 ч). Объяснения см. в тексте.

Нейрогенез полихеты *P. dumerilii* также начинается с образования одиночного периферического 5-HT-нейрона на заднем конце тела (Nezlin et al., 2010) (рис. 3, а). Затем появляется два 5-HT-нейрона в апикальном органе, а базальные отростки заднего нейрона идут вперед по вентральной стороне тела и формируют нерв прототроха (рис. 3, б). После этого трохофора платинереиса превращается в метатрохофору и очень быстро начинается формирование дефинитивной нервной системы вдоль путей, проложенных первыми нейронами. При этом первыми появляются дефинитивные нейроны в вентральных стволах (рис. 3, в).

Вскоре после появления первого заднего 5-HT-нейрона обнаруживаются первые FMRFa-нейроны: три в апикальном органе и один — на дорсальной стороне тела в районе прототроха. Отростки этого нейрона также маркируют нерв прототроха (рис. 3, г). Затем количество FMRFa-нейронов в районе апикального органа увеличивается, появляются два латеральных нейрона на нерве прототроха, а также проявляется FMRFa-иммунореакция в первом заднем 5-HT-нейроне (рис. 3, д). FMRFa-нейроны и отростки начинают быстро появляться в формирующейся дефинитивной нервной системе (рис. 3, е).

Иммунореакция против тубулина также показала, что других нервных стволов или комиссур, кроме вышеперечисленных, в теле трохофоры нет. Вообще *P. dumerilii* имеет сильно упрощенную лецитотрофную трохофору, которая живет в планктоне очень короткое время и быстро вступает в метаморфоз. Вероятно, с этим связано упрощенное строение ее нервной системы по сравнению с *Ph. maculata*. У раз-

витой трохифоры нервная система включает в себя нерв прототроха, парный ventральный ствол и апикальный сенсорный орган. (Подробнее о развитии нервной системы *P. dumerilii* см.: Nezlin et al., 2010).

Нейрогенез хитона *I. hakodadensis* начинается в передней полусфере (Voronezhskaya et al., 2002) (рис. 4). Первыми появляются две пары латеральных нейронов, которые иммунореактивны и к 5-НТ, и к FMRFa (рис. 4, а, з), а вскоре и 5-НТ-нейроны в апикальном сенсорном органе (рис. 2, а). Иммунореакция к FMRFa показала, что базальные отростки латеральных нейронов идут под основание апикального органа в район формирования церебрального ганглия, переходят на контролатеральную сторону и поворачивают назад по ventральной стороне тела, маркируя будущие ventральные стволы (рис. 4, д).

Вскоре после этого число 5-НТ- и FMRFa-нейронов в районе апикального органа увеличивается, и одновременно с этим начинается формирование дефинитивной нервной системы. Сначала появляются 5-НТ-нейроны в ventральных стволах (рис. 4, б), а затем педальные плексус и FMRFa-нейроны (рис. 4, в, е). Таким образом, нервная система трохифоры хитона состоит из апикального сенсорного органа, а также церебрального ганглия и педальных стволов, которые принадлежат уже к дефинитивной нервной системе. При метаморфозе нейроны апикального органа дегенерируют. (Подробнее о развитии нервной системы *Ph. maculata* см.: Voronezhskaya et al., 2002).

Нейрогенез мидии *M. trossulus* также начинается в передней полусфере, но с формирования не латеральных, а апикальных нейронов (Voronezhskaya et al., 2008). Сначала один, а потом еще три сенсорных 5-НТ-нейрона появляются в апикальном органе трохифоры (рис. 5, а), затем на стадии велигера их число увеличивается до пяти, а короткие базальные отростки иннервируют апикальную область (рис. 5, б). На стадии позднего велигера эти нейроны погружаются вглубь тела и, по-видимому, включаются в состав формирующегося церебрального ганглия (рис. 5, в).

Первые FMRFa-нейроны появляются практически сразу же после обнаружения первых 5-НТ-нейронов в количестве 4–5 штук и располагаются на апикальном полюсе личинки вокруг 5-НТ-нейронов. Затем на стадии велигера самый правый и самый левый из них смещаются ventрально и назад по латеральным сторонам тела и посылают по два отростка: один вперед и дорсально, а другой — назад и ventрально (рис. 5, д). Когда дорсальные отростки достигают области будущих церебральных ганглиев, в них начинают дифференцироваться первые дефинитивные нейроны. Когда на стадии позднего велигера ventральные отростки достигают области будущих педальных ганглиев, там также начинают дифференцироваться первые нейроны (рис. 5, д). После этого сенсорные FMRFa-нейроны апикального органа исчезают, а задние отростки пары латеральных

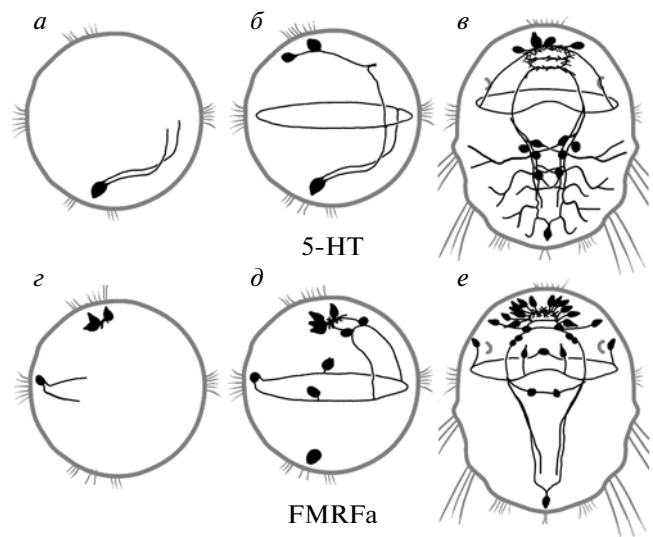


Рис. 3. Схема развития нервной системы трохифоры полихеты *P. dumerilii* (Nereida); иммунореакция против серотонина (а–в) и FMRFa (з–е) (по: Nezlin et al., 2010, с модификациями). Трохифора: а, з – ранняя (20 ч с начала развития), б, д – развитая (28 ч), в, е – ранняя метатрохифора (56 ч). Вид с латеральной (а, б, з, д) и ventральной (в, е) сторон; объяснения см. в тексте.

нейронов прорастают еще дальше назад в область будущих висцеральных ганглиев, где тоже начинается дифференцировка нейронов (рис. 5, е). Сами ла-

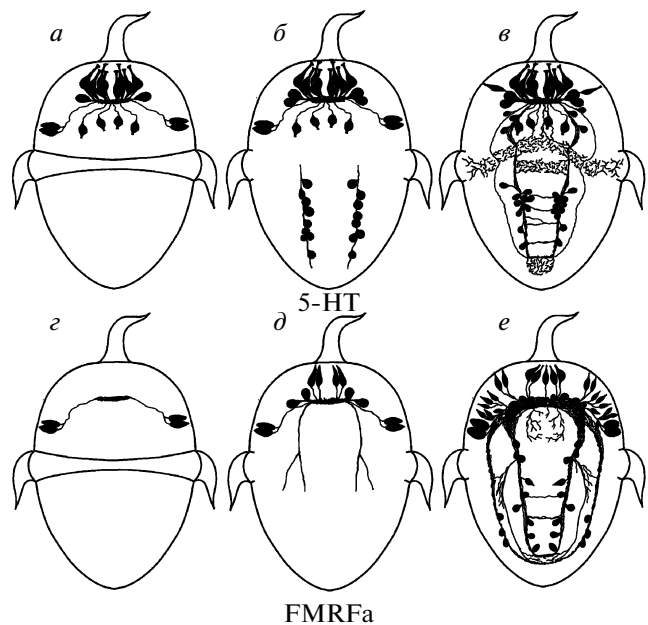


Рис. 4. Схема развития нервной системы трохифоры хитона *I. hakodadensis* (Mollusca, Плупласофора), вид с ventральной стороны; иммунореакция против серотонина (а–в) и FMRFa (з–е) (по: Voronezhskaya et al., 2002, с модификациями). Трохифора: а, з – ранняя (24 ч с начала развития), б, д – развитая (30 ч), в, е – поздняя (50 ч); объяснения см. в тексте.

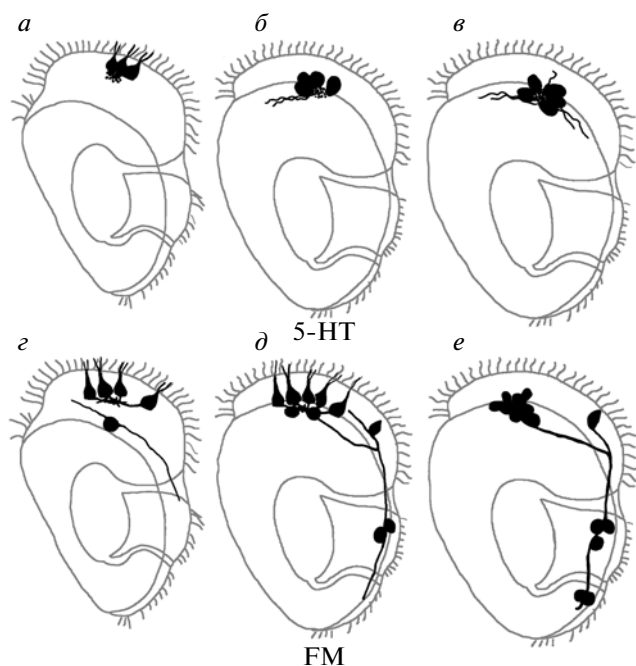


Рис. 5. Схема развития нервной системы трохофоры и велигера мидии *M. trossulus* (Mollusca, Bivalvia), вид с латеральной стороны; иммунореакция против серотонина (*a–в*) и FMRFa (*г, е*): *a, г* – трохофора – ранний велигер (36 ч с начала развития), *б, д* – развитая трохофора (48 ч), *в, е* – поздний велигер (5 сут; объяснения см. в тексте (по: Voronezhskaya et al., 2008, с модификациями).

теральные FMRFa-нейроны сохраняются на краю велама вплоть до оседания и метаморфоза.

Таким образом, нервная система трохофоры и велигера мидии состоит из апикального сенсорного органа и парного вентрального ствола, вдоль которого формируются парный церебральный, педальные и висцеральные ганглии. (Подробнее о развитии нервной системы *M. trossulus* см.: Voronezhskaya et al., 2008).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы вынесли “Золотой век сравнительной морфологии” в заголовок статьи, чтобы подчеркнуть, что иммуноцитохимическое маркирование в сочетании с лазерной сканирующей микроскопией позволяет легко и просто изучать закладку и развитие нервной системы с точностью до одиночных нейронов и их проекций. При этом, поскольку в нашем распоряжении имеются высокоспецифичные антитела против элементов нервной системы и лазерные конфокальные микроскопы, позволяющие выявлять на тотальных препаратах и адекватно записывать на носитель информации трехмерное изображение структур интереса вплоть до мельчайших деталей, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений (разумеется, при постановке соответствующих контролей). Это дало нам возможность перепроверить вызывающие сомнения литературные данные, особенно такие, которые много

лет кочуют из учебника в учебник и на основании которых строятся глобальные филогенетические теории.

Наши результаты, полученные при помощи флуоресцентной иммуноцитохимии и лазерной конфокальной микроскопии, показывают, что у репрезентативных видов полихет и моллюсков в развитии нервной системы нигде (ни на стадии трохофоры, ни на более ранних или поздних стадиях) нет никаких следов ортогона. Более того, полученные в последние годы литературные данные также согласуются с нашими. Как мы уже упоминали, подробная реконструкция нервной системы трохофоры полихеты *Spirobranchus* по серийным ультратонким срезам не выявила ортогона (Lakalli, 1984). Тщательное иммуноцитохимическое изучение развития нервной системы у полихеты *Pomatoceros lamarckii* (Serpulidae) также показало нервную систему, далекую от ортогона (McDougall et al., 2006).

Начиная с 80-х гг. XX в. исследователи получили в свои руки технику иммуноцитохимического маркирования нервной системы и стали активно изучать развитие нервной системы моллюсков (см. обзор литературы в: Croll, 2000). Ни один автор не описывает ничего похожего на ортогон. Кролл и Воронежская (Croll, Voronezhskaya, 1996) показали, что комбинация из антител против тубулина, серотонина и FMRFa выявляет самые первые элементы нервной системы в личиночном развитии гастропод и является надежным маркером для изучения дифференцировки и развития нервной системы. С тех пор эти и другие авторы изучили развитие личиночной нервной системы у многих гастропод: *Crepidula fornicata* (Prosobranchia) (Dickinson et al., 1999), *Aplysia californica* (Opisthobranchia) (Dickinson et al., 2000), *Ilyanassa obsoleta* (Prosobranchia) (Dickinson, Croll, 2003), *Lymnaea stagnalis* (Pulmonata) (Voronezhskaya et al., 1999; Voronezhskaya, Elekes, 2003). Никто не нашел ничего похожего на ортогон.

Изучались и другие моллюски. Так, никаких следов ортогона не было обнаружено в нейрогенезе хитона *Mopalia muscosa* (Polyplacophora) (Friedrich et al., 2002) и лопатоногого моллюска *Antalis entalis* (Scaphopoda) (Wanninger, Haszprunar, 2003). Не нашли ортогона и у трохофоры сипункулиды *Phascolion strombus* (Sipuncula) (Wanninger et al., 2005).

Таким образом, приходится признать, что данные, опубликованные Мейером (Meyer, 1901) и Вольтереком (Woltereck, 1904), не имеют отношения к нервной системе трохофоры полихет, а основанная на них трохофорная теория, которая предполагает, что трохофороподобная личинка с ортогональной нервной системой является анцестральной формой и доказывает родство Scolecida и Trochozoa, не отражает реальных филогенетических взаимоотношений между ними.

Теперь рассмотрим вопрос о сходстве и различиях в строении и развитии нервной системы трохофор в разных группах Trochozoa. Последовательность со-

бытий в нейрогенезе всех изученных нами трохофорных животных такова: сначала дифференцируются ранние периферические нейроны; их аксоны образуют контур будущей дефинитивной нервной системы; формируется личиночная нервная система; вдоль путей, проложенных ранними нейронами, формируется дефинитивная нервная система; личиночная нервная система и ранние нейроны исчезают или частично включаются в состав дефинитивной нервной системы. На этом сходство заканчивается.

Способ формирования и строение нервной системы трохофор изученных нами полихет, хитона и мидии разительно отличаются. При этом различия между двумя видами полихет, разумеется, не столь значительны, хотя тоже достаточно заметны.

Так, у филлодоце контур нервной системы формируется задним и двумя дорсальными 5-НТ-нейронами, а также тремя вентральными FMRFa-нейронами. Нейроны апикального сенсорного органа в этом участия не принимают. Дифференцировка нервной системы происходит в направлении сзади-вперед. Нервная система трохофоры состоит из апикального органа и связанного с ним церебрального ганглия, нерва прототроха, шести меридиональных нервов в эписфере, окологлоточного кольца и вентральных стволов, замкнутых в передней и задней части тела.

У платинереиса контур нервной системы формируют задний нейрон (он экспрессирует и 5-НТ, и FMRFa), 5-НТ-нейроны апикального органа и три FMRFa-нейрона — дорсальный и два латеральных. Дифференцировка нервной системы происходит в направлении сзади-вперед и спереди назад. Нервная система на стадии трохофоры — ранней метатрохофоры состоит из апикального органа и связанного с ним церебрального ганглия, нерва прототроха, четырех меридиональных нервов в эписфере и двух вентральных стволов с поперечными комиссурами.

А вот контур нервной системы хитона формируется двумя парами латеральных клеток в эписфере, которые экспрессируют и 5-НТ, и FMRFa. Дифференцировка нервной системы происходит в направлении спереди назад. Нервная система трохофоры состоит из мощного апикального органа, который впоследствии дегенерирует, и связанного с ним церебрального ганглия, двух вентральных и двух вентролатеральных стволов с поперечными комиссурами. Нерв прототроха отсутствует.

У мидии контур нервной системы формируется парой FMRFa-нейронов, расположенных на апикальном конце тела трохофоры, а 5-НТ-нейроны находятся только в апикальном органе. Дифференцировка нервной системы происходит в направлении спереди назад. Нервная система состоит из апикального органа, связанного с ним церебрального ганглия и пары вентральных стволов. Нерв прототроха также отсутствует.

Литературные данные дают нам еще большее разнообразие нейрогенезов. Например, у эмбрионов

заднежаберного брюхоногого моллюска *Aplysia californica* контур нервной системы очерчивают четыре задних FMRFa-нейрона, а нервная система трохофоры состоит лишь из апикальных 5-НТ-нейронов и двух вентральных стволов (Marois, Carew 1997a, b; Dickinson et al., 2000). Нервная система трохофоры пресноводного легочного брюхоногого моллюска *L. stagnalis* состоит из двух апикальных нейронов, трех задних нейронов и пары продольных стволов, замкнутых на заднем конце тела (Croll, Voronezhskaya, 1996).

Нервная система пилидиев немертин, которых часто причисляют к личинкам трохофорного типа (см., например: Иванова-Казас, 1985б; Schmidt-Rhaesa, 2007), отличается еще сильнее (Hay-Schmidt, 1990a–c; Nezhlin, 2000; Santagata, 2002). Недавно Чернышёв и Магарламов (2010) показали, что серотонинергическая часть нервной системы у атрохной личинки гоппонемертины *QuasitetraSTEMMA stimpsoni* состоит из нескольких апикальных и субапикальных нейронов, одиночного каудального нейрона и пары боковых стволов, которые являются частью формирующейся дефинитивной нервной системы. Если справедливо предположение авторов, что передние нейроны личинки включаются в состав дефинитивной нервной системы (аналогично тому, как это происходит у мидии), то собственно личиночная нервная система атрохной личинки состоит лишь из одиночного заднего нейрона. Столь значительные отличия от трохофор аннелид и моллюсков делают предположение о том, что атрохная личинка немертин гомологична трохофоре (Maslakova et al., 2004), маловероятным.

К трохофорам иногда также причисляют и личинку форонид актинотроху (см., например: Нуман, 1959), однако строения нервной системы актинотрох и трохофор еще сильнее отличаются (Незлин, 1988; Hay-Schmidt, 1990a–c; Nezhlin, 2000; Santagata, 2002). Мы считаем, что ни у немертин, ни у форонид трохофороподобной личинки нет и никогда не было. Если согласиться с теми, кто считает модифицированными трохофорами личинки типа актинотрохи, пилидия и даже личинки атрохного типа, то, как ранее писал Уиллмер (Willmer, 1990), практически любую свободноплавающую личинку можно назвать трохофорой, а значит, это определение теряет всякий смысл.

Но и среди тех животных, у кого есть личинка-трохофора, различия в строении и формировании личиночной нервной системы в разных группах настолько велики, что гомологичность трохофор внутри Trochozoa представляется нам весьма сомнительной. Трудно себе представить, что у гомологичных трохофор, очень похожих друг на друга внешне и занимающих одинаковую экологическую нишу, у одних видов ранние элементы нервной системы происходят из передней, а у других — из задней полусферы. У одних нерв прототроха формируется раньше всех и является основным компонентом нервной

системы, а у других отсутствует вовсе. У одних нейроны апикального органа дегенерируют, а у других становятся частью дефинитивной нервной системы. Этот список различий можно было бы продолжать.

В литературе последних десятилетий существует большое разнообразие мнений о гомологичности трохофороподобных личинок в разных группах беспозвоночных. Большинство исследователей считают, что личинка-трохофора первична и рекапитулирует личиночные формы предка (см., например: Jägersten, 1972; Nielsen, 2001; Schmidt-Rhaesa, 2007). Однако некоторые считают трохофор и вообще пелагические личинки вторичной вставкой в онтогенез донных животных и соответственно не придают им филогенетического значения, считая их конвергентно схожими (см., например: Bonik et al., 1979).

Третьи признают и эволюционную преемственность личинок, и возможность их конвергентной эволюции. Так, Сальвини-Плавен (Salvini-Plawen, 1980) считает, что личинки трохофорного типа у разных представителей Spiralia произошли независимо от общей лецитотрофной гипотетической формы, называемой перикалиммой. Схожих взглядов придерживается Иванова-Казас (1985а, б; 1986), которая, однако, считает общим предком трохофор не перикалимму, а личинку атрохного типа. По ее мнению, мюллеровская личинка поликладид и пилидий немертин принадлежат к трохофорному типу, но развились независимо друг от друга из личинок атрохного типа и не рекапитулируют признаков предков, общих с другими трохофорными животными (Иванова-Казас, 1986).

Наши данные полностью подтверждают идею Ивановой-Казас (1986) и Сальвини-Плавена (Salvini-Plawen, 1998) о том, что высокоспециализированные личинки морских беспозвоночных не могут считаться начальной точкой эволюции. Свободно плавающие личинки неизбежно должны подвергаться мощному конвергентному давлению отбора, поскольку это — специфическая жизненная стадия с очень упрощенным строением и очень малым набором функций и задач: расселение и оседание (Salvini-Plawen, 1980, 1998; Willmer, 1990; Иванова-Казас, 1995).

Более того, фундаментальные различия в строении и развитии нервной системы разных трохофор не позволяют нам считать, что они произошли от общего предка, пусть даже и независимо. Трохофоры в разных таксономических группах очень похожи внешне и занимают схожую экологическую нишу, но строение и развитие их нервной системы, которая является одной из самых эволюционно консервативных, если не самой консервативной, демонстрирует принципиальные различия. Идея дивергентного развития из общего предка противоречит нашим результатам.

Наоборот, логично предположить, что сходство между трохофорами в разных таксонах обусловлено конвергенцией, а личинки такого типа возникали в разных группах трохофорных животных совершен-

но независимо и, может быть, неоднократно. То есть необходимо признать, что теории, основанные на филогенетическом родстве личинок трохофорного типа, не только не доказывают родства Trochozoa и Scolecida, но и не отражают реальные филогенетические взаимоотношения внутри группы, называемой трохофорными животными. Необходимо исключить из филогенетических дискуссий ортогон и трохофору как анцестральную форму, общую для Lophotrochozoa или для их личинок.

Автор выражает глубокую благодарность своим коллегам, в соавторстве с которыми были опубликованы оригинальные работы, на основании которых написан этот обзор.

ЛИТЕРАТУРА

- Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т. 1. М.: Наука, 1964. 432 с.
- Бубко О.В., Львова Т.Г., Кулаковский Э.Г. Развитие нервной системы *Nephtys minuta* (Polychaeta) // Зоол. журн. 1979. Т. 58. С. 949–957.
- Иванова-Казас О.М. Происхождение и филогенетическое значение трохофорных личинок. 2. Эволюционное значение личинок целомических червей и моллюсков // Там же. 1985а. Т. 64. С. 650–660.
- Иванова-Казас О.М. 3. Личинки плоских червей и немертин // Там же. 1985б. Т. 64. С. 1765–1776.
- Иванова-Казас О.М. 4. Личинки Kamptozoa. Общие соображения // Там же. 1986. Т. 65. С. 165–174.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Макменагин М.Э.С. Возникновение разнообразия животных // В мире науки. 1987. № 6. С. 60–68.
- Мухитов А.Р., Архипова С.С., Никольский Е.Е. Световая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. М.: Наука, 2010. В печати.
- Незлин Л.П. Развитие моноаминергических нейронов у актинотрохи — планктонной личинки *Phoronopsis harmeri* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1988. Т. 24. С. 76–80.
- Сотников О.С., Богута К.К., Голубев А.И. и др. Механизмы структурной пластичности нейронов и филогенез нервной системы. СПб.: Наука, 1994. 240 с.
- Ушакова О.О., Евдонин Л.А. Становление нервной системы в личиночном онтогенезе *Brania clavata* (Nereimorpha, Syllidae) // Зоол. журн. 1987. Т. 66. С. 1148–1154.
- Чернышёв А.В., Магарламов Т.Ю. Первые данные о нервной системе личинок вооруженных немертин (Nemertea, Hoplonemertea) // Докл. АН. 2010. Т. 430. С. 571–573.
- Aguinaldo A.M., Turbeville J.M., Linford L.S. et al. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals // Nature. 1997. V. 387. P. 489–493.
- Åkesson B. On the nervous system of *Lopadorhynchus larva* (Polychaeta) // Arkiv för Zoologi. 1967. V. 20. P. 55–78.
- Bonik K., Grasshoff M., Gutmann W.F. Die Evolution von Laven als Verbreitungsstadien bodenlebender Meeres-tiere // Natur Museum. 1979. Bd. 109. S. 70–79.

- Bullock T.H., Horridge G.A.* Structure and function in the nervous systems of invertebrates. V. 1. San Francisco: Freeman, 1965. 798 p.
- Bütschli O.* Vorlesungen über vergleichende Anatomie. Berlin: J. Springer, 1921. 931 S.
- Child C.M.* The origin and development of the nervous system. Chicago: Univ. Press, 1921. 296 p.
- Croll R.P.* Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in embryonic pond snails // *Microsc. Res. Tech.* 2000. V. 49. P. 570–578.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E.* Early elements in gastropod neurogenesis // *Devel. Biol.* 1996. V. 173. P. 344–347.
- Dawydoff C.* Ontogenèse des annelids // *Traité de Zoologie*. Ed. Grassé P. Paris: Masson & Cie, 1959. P. 594–686.
- Dickinson A.J.G., Croll R.P.* Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta* // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 466. P. 197–218.
- Dickinson A.J.G., Nason J., Croll R.P.* Histochemical localization of FMRFamide, serotonin and catecholamine in embryonic *Crepidula fornicata* (Prosobranchia: Gastropoda) // *Zoomorphology*. 1999. V. 119. P. 49–62.
- Dickinson A.J.G., Croll R.P., Voronezhskaya E.E.* Development of embryonic cells containing serotonin, catecholamines and FMRFamide-related peptides in *Aplysia californica* // *Biol. Bull.* 2000. V. 199. P. 305–315.
- Field K.G., Olsen G.J., Lane D.J. et al.* Molecular phylogeny of the animal kingdom // *Science*. 1988. V. 239. P. 748–753.
- Friedrich S., Wanninger A., Brückner M. et al.* Neurogenesis in the mossy chiton, *Mopalia muscosa* (Gould) (Polyplacophora): evidence against molluscan metamerism // *J. Morphol.* 2002. V. 253. P. 109–117.
- Halanych K.M., Bacheller J.D., Aguinaldo A.M. et al.* Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals // *Science*. 1995. V. 267. P. 1641–1643.
- Handbook of biological confocal microscopy / Ed. *Pawley J.B.* N.Y.: Springer, 2006. 987 p.
- Hanström B.* Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. Berlin: J. Springer, 1928. 628 S.
- Hatschek B.* Studien über Entwicklungsgeschichte der Anneliden // *Aeb. Zool. Inst. Wien.* 1878. Bd. 1. S. 277–404.
- Hatschek B.* Lebrbuch der Zoologie. 1. Lieferung. Jena: Gustav Fischer, 1888. S. 1–144.
- Hay-Schmidt A.* Distribution of catecholamine-containing, serotonin-like and neuropeptide FMRFamide-like immunoreactive cells and processes of the nervous system of the actinotroch larva of *Phoronis muelleri* (Phoronida) // *Cell Tiss. Res.* 1990a. V. 259. P. 105–118.
- Hay-Schmidt A.* Catecholamine-containing, serotonin-like, and FMRFamide-like immunoreactive cells and processes of the nervous system of the early actinotroch larva of *Phoronis vancouverensis* (Phoronida) distribution and development // *Can. J. Zool.* 1990b. V. 68. P. 1525–1536.
- Hay-Schmidt A.* Catecholamine-containing, serotonin-like and neuropeptide FMRFamide-like immunoreactive cells and processes of the nervous system of the pilidium larva (Nemertini) // *Zoomorphology*. 1990c. V. 109. P. 231–244.
- Hay-Schmidt A.* The larval nervous system of *Polygordius lacteus* Scheider 1868 (Polygordiidae, Polychaeta): immunocytochemical data // *Acta Zool.* 1995. V. 76. P. 121–140.
- Hessling R., Purschke G.* Immunohistochemical (cLSM) and ultrastructural analysis of the central nervous system and sense organs in *Aeolosoma hemprichi* (Annelida, Aeolosomatidae) // *Zoomorphology*. 2000. V. 120. P. 65–78.
- Hessling R., Westheide W.* Are Echiura derived from a segmented ancestor? Immunohistochemical analysis of the nervous system in developmental stages of *Bonellia viridis* // *J. Morphol.* 2002. V. 252. P. 100–113.
- Hibbs A.* Confocal microscopy for biologists. N.Y.: Springer, 2004. 474 p.
- Hyman L.H.* The invertebrates. Smaller coelomate groups. N.Y.: McGraw-Hill, 1959. 783 p.
- Jägersten G.* Evolution of the metazoan life cycle. L.; N.Y.: Academic Press, 1972. 282 p.
- Kim C.B., Moon S.Y., Gelder S.R. et al.* Phylogenetic relationships of annelids, molluscs, and arthropods evidenced from molecules and morphology // *J. Mol. Evol.* 1996. V. 43. P. 207–215.
- Kleinenberg N.* Die Entstehung des Annelids aus der Larve von *Lopadorhynchus* // *Z. Wiss. Zool.* 1886. Bd. 44. S. 1–227.
- Kuhlenbeck H.* The central nervous system of vertebrates. V. 2. Invertebrates and origin of vertebrates. Basel: Karger, 1967. 238 p.
- Lacalli T.C.* Structure and organization of the nervous system in the trochophore larva of *Spirobranchus* // *Phil. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci.* 1984. V. 306. P. 79–135.
- Mallatt J., Winchell C.J.* Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 289–301.
- Marois R., Carew T.J.* Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica* // *J. Comp. Neurol.* 1997a. V. 386. P. 477–490.
- Marois R., Carew T.J.* Fine structure of the apical ganglion and its serotonergic cells in the larva of *Aplysia californica* // *Biol. Bull.* 1997b. V. 192. P. 388–398.
- Maslakova S.A., Martindale M.Q., Norenburg J.L.* Vestigial prototroch in a basal nemertean, *Carinoma tremaphoros* (Nemertea; Palaeonemertea) // *Evol. Devel.* 2004. V. 6. P. 219–226.
- McDougall C., Chen W.-C., Shimeld S.M. et al.* The development of the larval nervous system, musculature and ciliary bands of *Pomatoceros lamarckii* (Annelida): heterochrony in polychaetes // *Front. Zool.* 2006. V. 3. (16 doi: 10.1186/1742-9994-3-16)
- Meyer E.* Studien über den Körperbau der Anneliden. V. Das Mesoderm der Ringelwürmer // *Mitt. Zool. Stn. Neapel.* 1901. Bd. 14. S. 247–584.
- Nezlin L.P.* Tornaria of hemichordates and other dipleurola-type larvae: a comparison // *Zool. Syst. Evol. Res.* 2000. V. 38. P. 149–156.
- Nezlin L.P., Yushin V.V.* Structure of the nervous system in the tornaria larva of *Balanoglossus proterogonius* (Hemichordata: Enteropneusta) and its phylogenetic implications // *Zoomorphology*. 2004. V. 123. P. 1–13.

- Nezlin L.P., Ponimaskin E.B., Voronezhskaya E.E. Neuronal development in the polychaete *Platynereis dumerilii* // J. Comp. Neurol. 2010. In press.
- Nielsen C. Animal evolution: interrelations of living phyla. Oxford: Univ. Press, 2001. 563 p.
- Nielsen C. Trochophora larvae: cell lineages, ciliary bands and body regions. 1. Annelida and Mollusca // J. Exp. Zool. (Mol. Devel. Evol.) 2004. V. 302B. P. 35–68.
- Nielsen C. Other groups and general discussion // Ibid. 2005. V. 304B. P. 401–447.
- Peterson K.J., Eernisse D.J. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences // Evol. Devel. 2001. V. 3. P. 170–205.
- Peterson K.J., Cameron R.A., Davidson E.H. Bilaterian origins: significance of new experimental observations // Devel. Biol. 2000. V. 219. P. 1–17.
- Reisinger E. Untersuchungen am Nervensystem der *Bothrioplana semperi* Braun // Z. Morphol. Ökol. Tiere. 1925. Bd. 5. S. 119–149.
- Reisinger E. Die Evolution des Orthogons der Spiraler und das Archicöломатенproblem // Z. Zool. Syst. Evol. 1972. Bd. 10. S. 1–43.
- Salvini-Plawen L. Was ist eine Trochophora? Eine Analyse der Larventypen mariner Protostomier // Zool. Jahrb. Anat. 1980. Bd. 103. S. 389–423.
- Salvini-Plawen L. The urochordate larva and archichordate organization: chordate origin and anagenesis revisited // J. Zool. Syst. Evol. Res. 1998. V. 36. P. 129–145.
- Santagata S. Structure and metamorphic remodeling of the larval nervous system and musculature of *Phoronis pallida* (Phoronida) // Evol. Devel. 2002. V. 4. P. 28–42.
- Schmidt-Rhaesa A. The evolution of organ systems. Oxford: Univ. Press, 2007. 385 p.
- Tessmar-Raible K., Arendt D. Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa // Curr. Opin. Gen. Devel. 2003. V. 13. P. 331–340.
- Voronezhskaya E.E., Elekes K. Expression of the FMRFamide gene encoded peptides by identified neurons in embryos and juveniles of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* // Cell Tiss. Res. 2003. V. 314. P. 297–313.
- Voronezhskaya E.E., Hiripi L., Elekes K. et al. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors // J. Comp. Neurol. 1999. V. 404. P. 285–296.
- Voronezhskaya E.E., Tyurin S.A., Nezlin L.P. Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora) // Ibid. 2002. V. 444. P. 25–38.
- Voronezhskaya E.E., Tsitrin E.B., Nezlin L.P. Neuronal development in larval polychaete *Phyllodoce maculata* (Phyllodoceidae) // Ibid. 2003. V. 455. P. 299–309.
- Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Odintsova N.A. et al. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Zoomorphology. 2008. V. 127. P. 97–110.
- Wanninger A., Haszprunar G. The development of the serotonergic and FMRF-amidergic nervous system in *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda) // Ibid. 2003. V. 122. P. 77–85.
- Wanninger A., Koop D., Bromham L. et al. Nervous and muscle system development in *Phascolion strombus* (Sipuncula) // Devel. Genes Evol. 2005. V. 215. P. 509–518.
- Willmer P. Invertebrate relationships. Patterns in animal evolution. Cambridge: Univ. Press, 1990. 416 p.
- Woltereck R. Wurm Kopf, Wurm rumpf und Trochophora // Zool. Anz. 1904. Bd. 28. S. 273–322.

The Golden Age of Comparative Morphology: Laser Scanning Microscopy and Neurogenesis of Trochophore Animals

L. P. Nezlin

Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: nezlin@mail.ru

In the metameric annelids recapitulating ancestral oligomeric state in their ontogenesis, orthogon is a derivative of diffuse plexus.

*Student folklore of the Biological Department,
Moscow State University*

Abstract—Immunochemical labeling of neuronal elements and laser confocal microscopy have considerably expanded the capacity of comparative morphology and allowed us to monitor the neurogenesis of various trochophore animals at the level of individual identified neurons and their projections. It has been demonstrated that many generally accepted concepts of the larval nervous system and the phylogenetic theories constructed on this basis are incorrect. Comparative analysis has demonstrated that the orthogon brain is absent at all developmental stages in the representative Lophotrochozoa members. Fundamental differences in the structure and development of the nervous system have been found in the trochophores belonging to different taxonomic groups within Lophotrochozoa; these differences demonstrate that the trochophore larva in these groups are not homologous, while their similarity is most likely a result of convergence. Our results challenge the concept of trochophore as the ancestral form common for all trochophore animals. It is necessary to exclude from phylogenetic discussions the orthogon as a basic plan for the structure of the nervous system and the trochophore as an ancestral form for all Lophotrochozoa.

Key words: trochophore, neurogenesis, orthogon, mollusks, polychaetes, phylogeny