

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ БЛАСТОМЕРОВ ПОЛИХЕТЫ *ALITTA VIRENS*

© 2017 г. Р. П. Костюченко*, А. К. Дондуа

Санкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

*E-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2016 г.

Способность к регуляции, в том числе восстанавливать недостающие части, нормализуя развитие, является фундаментальной характеристикой живых систем. Однако представители группы Spiralia (животные со спиральным типом развития) до недавнего времени считались типичным примером детерминативного развития. Вместе с тем, исследования последних лет дают основания говорить о наличии индуктивных межклеточных взаимодействий на самых ранних этапах развития зародышей Spiralia. В данной работе мы впервые показали развитие бластомеров полихеты *Alitta virens*, изолированных на различных стадиях. Результаты свидетельствуют о неспособности частичных зародышей *A. virens* к регуляции до целой нормальной личинки и о высокой степени автономности детерминации трохобластных клеток. В то же время, полученные данные говорят в пользу вероятной ранней индукции бластомера *D* и приобретения им компетенции к дальнейшему развитию трохобластных ресничных клеток.

Ключевые слова: изоляция бластомеров, спецификация клеток Spiralia, клеточные линии, трохобласт, цитодифференциация, трохофора, полихеты

DOI: 10.7868/S0475145017030077

ВВЕДЕНИЕ

Еще на заре экспериментальной эмбриологии, когда создавались предпосылки для основных современных парадигм биологии развития (дифференциальная экспрессия генов и избирательные межклеточные взаимодействия) главными вопросами были возможность регуляции части зародыша до целого и механизмы определения клеточной судьбы. Многочисленные эксперименты показали как возможность автономного развития частей зародыша и отдельных клеточных линий, так и различных типов регуляции процессов развития. Регуляция не только способствует правильному паттернированию, но и восстановлению утраченной по какой-либо причине части зародыша. Так эмбриональная регуляция, как одна из разновидностей регенерации (Короткова, 1997), встречается у многих видов животных. В естественных условиях, она характерна для примитивных животных с анархическим типом дробления (Иванова-Казас, 1975). Кроме того, даже у млекопитающих существует полиэмбриония, одна из форм бесполого размножения, вероятно возникающая именно на основе эмбриональной регуляции (Иванова-Казас, 1977а; Костюченко и др., 2016).

Классические эксперименты на асцидиях, моллюсках и аннелидах говорят о вероятном

определении судьбы многих типов клеток еще на ранних стадиях развития, прежде всего, за счет сегрегации морфогенетически значимых веществ цитоплазмы яйца. Так, у полихет и моллюсков личинки трохофоры имеют особый провизорный локомоторный орган – прототрох, состоящий из ресничных клеток – трохобластов. У разных видов животных прототрох сходен по строению и происхождению. Клетки прототроха демонстрируют самые ранние признаки дифференцировки во всем теле зародыша. Уже на стадии 16-клеточного зародыша формируются клетки-основательницы так называемых первичных трохобластов $1m^2$ (m – любой квадрант: *A*, *B*, *C* или *D*). Во время пятого деления дробления образуются клетки-основательницы добавочных или аксессуарных трохобластов ($1m^{12}$), а во время шестого – третьей группы, вторичных трохобластов ($2m^{11}$) (Wilson, 1904а, 1904б; Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997; Ackermann et al., 2005; Костюченко, Дондуа, 2006). После своего обособления клетки всех этих групп делятся не более двух раз, и их пролиферативная активность полностью прекращается (Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997; Костюченко, Дондуа, 2006).

Особенности дифференцировки трохобластного типа неоднократно привлекали внимание

исследователей. В экспериментах по изоляции бластомеров у различных представителей Spiralia было показано, что в основе спецификации трохобластов могут лежать как механизмы автономной детерминации, так и зависимой от индуктивных воздействий окружающих клеток. Например, у моллюска *Patella* и полихеты *Nereis limbata* трохобласты специфицируются автономно (Wilson, 1904; Costello, 1945), а у моллюсков *Lymnaea* (Arnolds, 1982; Martindale et al., 1985) и *Ilyanassa* (Clement, 1962), судьба трохобластов определяется при взаимодействии с другими клетками. При более тщательных исследованиях изменение судьбы некоторых ресничных клеток в результате взаимодействия с окружением было показано и для моллюска *Patella vulgata* (Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997). Более того, наличие индуктивных взаимодействий в развитии моллюсков было продемонстрировано на примере многих клеточных типов, развития органов и даже при закладке дорсовентральной оси (Clement, 1952, 1956; van den Biggelaar, 1977; van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994; Sweet, 1998; Lambert, Nagy, 2001).

Исследования последних лет показали, что существенным элементом индуктивных процессов в раннем развитии Spiralia служат молекулярные механизмы передачи сигналов от одной клетки к геному другой, т.е. клеточный сигналинг (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008; Козин и др., 2013; Kozin et al., 2016). В частности, каскад сигнального пути MAPK дифференциально активируется у зародыша *Ilyanassa* именно на стадии, когда происходит взаимодействие между макромером *3D* и микромерами. Ликвидация источника сигнала, макромера *3D*, предотвращает нормальную активацию MAPK в микромерах, что препятствует спецификации всего квадранта *D*.

В данной работе впервые приведены данные о развитии бластомеров полихеты *Alitta virens*, изолированных на различных стадиях. Результаты экспериментов в целом согласуются с ранее полученными данными на других видах полихет и моллюсков. Они свидетельствуют о неспособности частичных зародышей *A. virens* к регуляции до полноценной личинки и о высокой степени автономности детерминации трохобластных клеток. Вместе с тем полученные результаты говорят в пользу вероятной индукции бластомера *D* и приобретения им компетенции к дальнейшему развитию трохобластных ресничных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелые роящиеся особи *Alitta virens* были собраны во второй половине июня—начале июля у поверхности воды в районе Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета в губе Чупа Белого

моря. Самцов и самок отлавливали отдельно. Полученные от зрелых животных гаметы использовали для искусственного осеменения (Дондуа, 1975). Содержание культур зародышей и личинок проводили в профильтрованной морской воде при температуре 10.5°C в стеклянных сосудах объемом 4 л при постоянном перемешивании в с помощью автоматических мешалок (Костюченко, Дондуа, 2006).

Для изоляции бластомеров использовали зародышей на стадиях двух, четырех, восьми и шестнадцати бластомеров. Повторные уточняющие эксперименты на четырехклеточной стадии проводили сразу после полного завершения второго деления дробления и через 40 мин. В каждой серии экспериментов использовали зародышей от трех пар родителей. Партии по 20–30 зародышей отдельно помещали в небольшой объем раствора Tris-CMFSW (искусственная морская вода, свободная от ионов кальция и магния с добавлением Tris и EDTA: 6.055 г Tris, 28.933 г NaCl, 0.723 г KCl, 3.920 г Na₂SO₄, 0.193 г NaHCO₃, 1.861 г EDTA, воды дистиллированной — до 1 л, pH 8.0) (Костюченко, 1999; Kozin et al., 2016). Далее, после одной смены Tris-CMFSW, при слабом механическом помешивании в течение 8–12 мин удаляли слизистую оболочку и оболочку оплодотворения. При переносе в натуральную пастеризованную морскую воду через две короткие смены CMFSW зародыши в контроле, подвергшиеся такой обработке, демонстрируют полную жизнеспособность. Разделение эмбрионов на отдельные бластомеры производили во второй смене CMFSW при слабом пипетировании. Вся процедура занимала не более 20 мин. Дальнейшее культивирование осуществляли на фильтрованной пастеризованной натуральной морской воде. Смену воды производили два раза в сутки. Через 2.5 сут после оплодотворения, объекты фиксировали 4%-ным формалином на 1.75-кратном фосфатном буфере. В дальнейшем материал анализировали стандартными методами иммуноцитохимии. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела против α - и β -тубулина (“Sigma”, США), в качестве вторичных — противомышинные, конъюгированные с Cy5 (“Jackson ImmunoResearch”, США). Окраску на ДНК проводили с помощью красителя TO-PRO-1 (“Molecular Probes”, США). Материал изучали методом конфокальной микроскопии с помощью микроскопа “Leica TCS” (Германия), а также методами микроскопии светлого поля и дифференциального интерференционного контраста (DIC), используя микроскоп Axio Imager D1, оснащенный камерами AxioCam ICc3 и AxioCam MRm и программным обеспечением AxioVision 4.8 (“Carl Zeiss”, Германия).

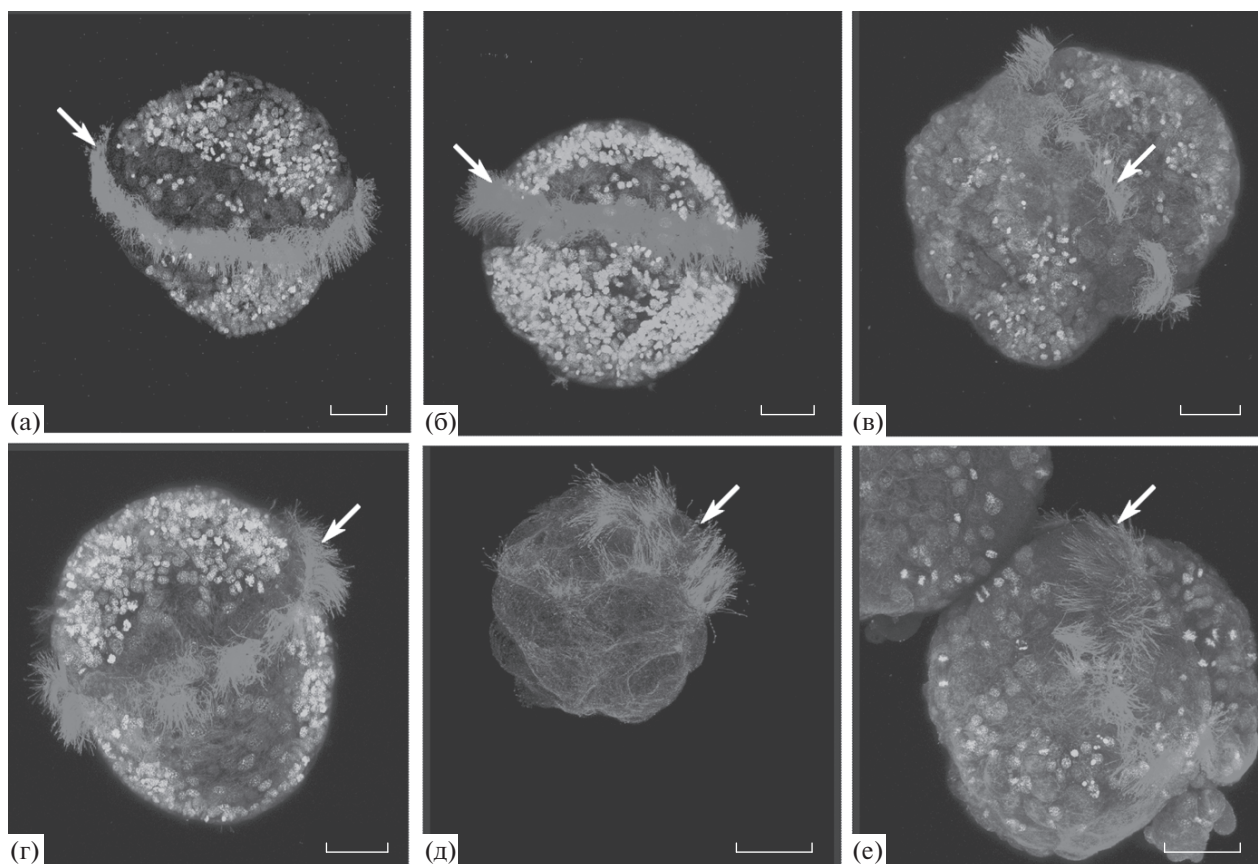


Рис. 1. Развитие *A. virens* в норме и после экспериментального вмешательства, через 2.5 сут после оплодотворения. Максимальные проекции конфокальных Z-стеков. (а–г, е) – окраска на тубулин и хромосомный материал; (д) – окраска только на тубулин. (а, б) – трохофорные личинки (контроль) в различных проекциях: объект (а) имеет признаки нарушения формы, строение прототроха соответствует норме; объект (б) полностью соответствует норме; (в, г) – развитие зародышей, подвергнутых освобождению от оболочки оплодотворения на 4-клеточной стадии, но не разделению на отдельные бластомеры; (д) – развитие изолированного бластомера АВ; (е) – развитие изолированного бластомера CD. Стрелкой указаны ресничные образования. Масштаб 40 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раннее развитие *Alitta virens* идет путем типичного спирального гетероквадрантного дробления. В результате неравного деления зиготы формируются два сильно отличающиеся друг от друга бластомера – АВ и CD. Спустя 1.5 ч формируется четырехклеточная стадия, причем клетки-основательницы четырех квадрантов, т.е. линий А, В, С и D различаются в размерах. Самым крупным бластомером является D, бластомер С – второй по величине, а образующиеся из бластомера АВ клетки А и В имеют приблизительно одинаковые размеры (Костюченко, Дондуа, 2000; Костюченко, Дондуа, 2006). Дробление, как и созревание ооцита, сопровождается процессом ооплазматической сегрегации, в результате чего линия D наделается большей частью прозрачной, свободной от желтка и липидов цитоплазмы (Dondua et al., 1997; Костюченко, Дондуа, 2000). Квадрант D, как известно, имеет особую судьбу: он представляет собой зачаток большей части покровов тела

личинки и личиночной мезодермы и маркирует дорсальную сторону зародыша (Иванова-Казас, 1977б; Костюченко, Дондуа, 2006). Известно также, что в ходе дальнейшего дробления появляются клетки-основательницы клеток прототроха (первичных трохобластов на пятом клеточном цикле, и далее – добавочных (аксессуарных) и вторичных тохобластов), которые делятся лишь ограниченное количество раз и претерпевают дифференцировку, формируя локомоторный орган личинки трохофоры (Костюченко, Дондуа, 2006). Трохобласты основного кольца прототроха – крупные продолговатые клетки. К 30 ч развития зародыша они полностью сформированы и занимают постоянную позицию. Часть других клеток прототроха, называемых опорными клетками к этому времени еще не приняли окончательной формы и позиции относительно других клеток. К 40 ч развития основные клетки прототроха развивают реснички, которые уже к 44 ч сильно удлиняются и прорастают сквозь оболочку оплодотво-

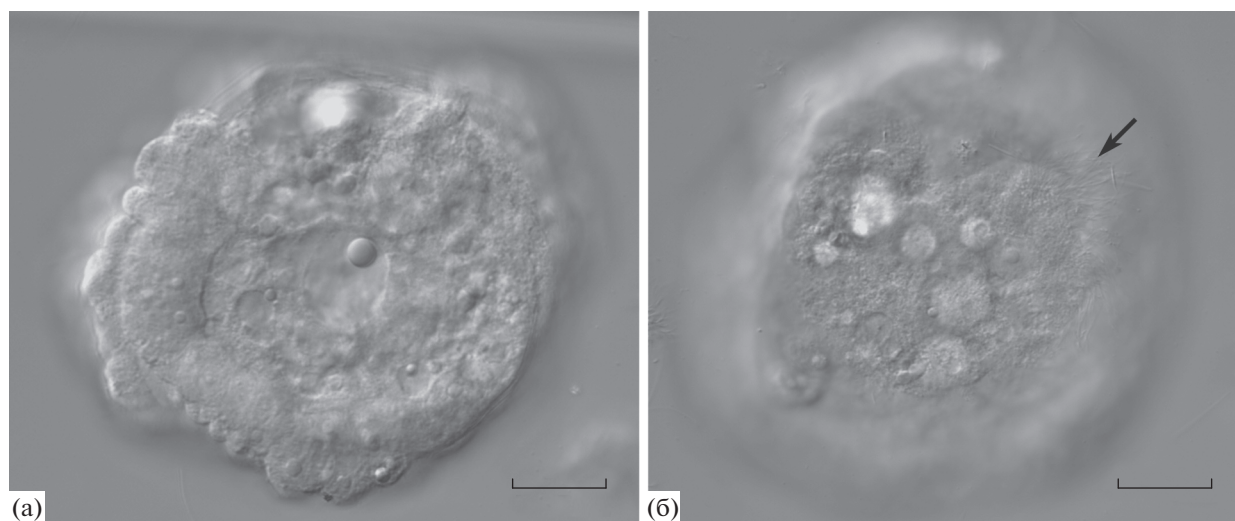


Рис. 2. Развитие изолированных бластомеров *D* на ранней и поздней 4-клеточной стадии зародышей *A. virens*, 2.5 сут после оплодотворения (DIC). (а) – развитие бластомера *D*, изолированного сразу после образования 4-клеточной стадии, ресничные клетки отсутствуют; (б) – развитие бластомера *D*, изолированного через 40 мин после образования 4-клеточной стадии, ресничные клетки присутствуют. Стрелкой указаны ресничные образования. Масштаб 40 мкм.

рения (рис. 1а, 1б). После прекращения делений трохобласты *A. virens* начинают пигментироваться и приобретают красноватую окраску, хорошо различимую в микроскоп при прижизненных наблюдениях (Дондуа и др., 1996; Костюченко, Дондуа, 2006).

В настоящей работе нами выполнены эксперименты по изоляции бластомеров полихеты *A. virens* (на стадиях двух, четырех, восьми и шестнадцати бластомеров) и прослежена судьба каждого из них до стадии развития 2.5 сут после оплодотворения, когда признаки дифференцировки ресничных клеток и все основные зачатки личинки трохофоры хорошо развиты. В качестве контроля влияния процедуры и, в частности, растворов, применяемых для снятия оболочки оплодотворения, мы использовали зародышей двух- и четырехклеточных стадий, у которых удаляли оболочки, но не отделяли бластомеры друг от друга. Такие объекты демонстрировали полную жизнеспособность и формировали все необходимые структуры, в том числе прототрох, стомодеум, внутренние домены клеток, напоминающие мезодермальные полосы, хотя компактность и форма таких личинок варьировала (рис. 1в, 1г).

Изоляция на отдельные бластомеры и дальнейшее их культивирование привели к результатам, в основном схожим с полученными ранее на других видах аннелид и моллюсков (Wilson, 1904; Costello, 1945; Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997). Отдельно развивающиеся бластомеры *AB* и *CD* в результате дробления формировали плотные округлые, но часто вытянутые и слегка неправильной формы, клеточные конгломераты, в состав которых входят ресничные

клетки (рис. 1д, 1е), не имеющие, однако, пигмента. Восстановления до полных личинок не происходило, хотя в отличие от клеток линии *AB*, потомки *CD* давали частичных зародышей с большим количеством клеток и с внутренним строением, напоминающим мезодермальные полосы. Однако стоит отметить, что формирующиеся частичные зародыши во всех случаях демонстрировали заметную вариабельность внешней формы и компактности клеточного материала. Результаты изоляции и дальнейшего развития отдельных бластомеров *A. virens*, взятых на более поздних стадиях (вплоть до стадии 16 клеток) согласуются с ранее полученными данными на моллюсках *Patella coerulea* и *Patella vulgata* (Wilson, 1904; Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997) и полихете *Nereis limbata* (Costello, 1945). Каждый изолированный бластомер давал ожидаемый набор клеток, имеющих или не имеющих в своем составе ресничных клеток (не показано). Исключение составляет лишь развитие изолированных на четырехклеточной стадии бластомеров *D*. Выяснилось, что способность проявлять признаки трохобластной дифференцировки потомками этого бластомера зависит от времени проведения эксперимента. Так, если клетку *D* изолировать сразу после формирования четырехклеточного зародыша, то среди потомков не обнаружено ни одной ресничной клетки (рис. 2а). Если эксперимент провести через 40 мин после образования начала четырехклеточной стадии, то развивающиеся частичные зародыши имеют в своем составе ресничные клетки (рис. 2б). Такой феномен для нереидных полихет продемонстрирован впервые. Костелло (Costello, 1945), работая на

американском виде *Nereis limbata*, показал, что все изолированные клетки-основательницы четырех эмбриональных квадрантов (*A*, *B*, *C* и *D*) дают определенный набор ресничных клеток. Однако, несмотря на определенную степень детерминативности судьбы трохобластных ресничных клеток, реснички могут развиваться, вторично теряться, а в некоторых случаях их формирование может репрессироваться в зависимости от взаимодействия между клетками зародыша. Такой эффект был показан на моллюсках *Lymnaea* (Arnolds, 1982; Martindale et al., 1985) и *Ilyanassa* (Clement, 1962), *Patella vulgata* (Damen, Dictus, 1994; Damen, 1994; Dictus, Damen, 1997). Важно также подчеркнуть, что все предыдущие эксперименты по разделению бластомеров на моллюсках и полихетах производились на тепловодных видах, у которых продолжительность между делениями дробления не превышает 30 мин. В случае *A. virens* время между делениями на ранних стадиях дробления составляет 1.5 ч при температуре 10.5°C, что представляет для развития дополнительные возможности для более тонкой регуляции путем взаимодействия между бластомерами. Так, нами недавно было показано, что у зародышей *A. virens* активная форма MAPK хорошо выявляется антителами в клетках линии *C* и *D* уже при переходе от 8-ми к 10-ти клеточному зародышу (Kozin et al., 2016). Известно также, что фармакологическая модуляция уровня канонического Wnt сигналинга вызывает существенные изменения в клеточной композиции и количестве ресничных клеток у близкородственной полихеты *Platynereis dumerilii* (Schneider, Bowerman, 2007). Тот факт, что *CD* (бластомер-предшественник линии *D*), равно как и потомки самого бластомера *D*, в случае его изоляции на поздней, но не ранней четырехклеточной стадии, дают ресничные клетки, говорит в пользу вероятной индукции бластомера *D* и приобретения им компетенции к дальнейшему развитию трохобластных ресничных клеток.

Исследования проведены при финансовой поддержке гранта СПбГУ 1.38.209.2014 с использованием инфраструктуры МБС СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дондуа А.К., Доррештейн А., Костюченко Р.П., Федорова Ж.Е., Фишер А. Влияние афидиколина на дифференциацию трохобластов в раннем онтогенезе полихет // Онтогенез. 1996. Т. 27. № 6. С. 419–426.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука, 1975. 372 с.
- Иванова-Казас О.М. Бесполое размножение животных. Л.: Изд. Ленингр. ун-та, 1977а. 240 с.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Трохофорные, щупальцевые, щетинкочелюстные, погонофоры. М.: Наука, 1977б. 312 с.
- Козин В.В., Бабаханова Р.А., Костюченко Р.П. Участие MAP-киназного сигналинга в спецификации клеточных линий и дорсоventральной оси у примитивной гастроподы *Testudinalia testudinalis* (Patello-gastropoda, Mollusca) // Онтогенез. 2013. Т. 44. № 1. С. 42–56.
- Костюченко Р.П. Процессы ооплазматической сегрегации и формирования клеточной линии трохобластов в раннем развитии *Nereis virens*. Дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 1999. 129 с.
- Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Ооплазматическая сегрегация и формирование морфологических осей зародыша полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 120–131.
- Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Закономерности формирования прототроха в эмбриональном развитии полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 91–99.
- Костюченко Р.П., Козин В.В., Купряшова Е.Е. Регенерация и бесполое размножение у аннелид: клетки, гены и эволюция // Известия Российской Академии Наук Серия Биологическая. 2016. Т. 43. № 3. С. 231–241.
- Короткова Г.П. Регенерация животных. СПб: Изд-во С-Петербургского ун-та, 1997. 479 с.
- Arnolds W.J.A. Early development of maternally determined mutant dauerblastulae in *Lymnaea stagnalis* L.: Cellular interactions in the dorsalization of head quadrants // Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C. 1982. V. 85. P. 635–662.
- Ackermann C., Dorresteijn A., Fischer A. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta) // J. Morphol. 2005. V. 266. P. 258–280.
- Clement A.C. Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. I. The role of the polar lobe in determination of the cleavage pattern and its influence in later development // J. Exp. Zool. 1952. V. 121. P. 593–626.
- Clement A.C. Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. II. The development of isolated blastomeres // J. Exp. Zool. 1956. V. 132. P. 427–446.
- Clement A.C. Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages // J. Exp. Zool. 1962. V. 149. P. 193–216.
- Costello D.P. Experimental studies of germinal localization in *Nereis*. I. The development of isolated blastomeres // J. Exp. Zool. 1945. V. 100. P. 19–66.
- Damen P. Cell-lineage, and specification of developmental fate and dorsoventral organisation in the mollusc *Patella vulgata*. Thesis. University of Utrecht, 1994. 147 p.
- Damen P., Dictus W.J.A.G. Cell lineage of the prototroch of *Patella vulgata* (Gastropoda, Mollusca) // Dev. Biol. 1994. V. 162. P. 364–383.
- Dictus W.J.A.G., Damen P. Cell lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca) // Mech. Dev. 1997. V. 62. P. 213–226.
- Dondua A.K., Kostyuchenko R.P., Fedorova Zh.E. Effects of some cytoskeleton inhibitors on ooplasmic segregation in the *Nereis virens* egg // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. P. 853–858.

- Henry J.J., Perry K.J. MAPK activation and the specification of the D quadrant in the gastropod mollusc, *Crepidula fornicata* // Dev. Biol. 2008. V. 313. P. 181–195.
- Koop D., Richards G.S., Wanninger A., Gunter H.M., Degnan B.M. The role of MAPK signaling in patterning and establishing axial symmetry in the gastropod *Haliois asinina* // Dev. Biol. 2007. V. 311. P. 200–212.
- Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P. Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete *Alitta virens* (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers Twist, Mox, Evx and functional role for MAP kinase signaling // Mech. Dev. 2016. V. 140. P. 1–11.
- Lambert J.D., Nagy L.M. MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta* // Development. 2001. V. 128. P. 45–56.
- Lambert J.D., Nagy L.M. The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos // Dev. Biol. 2003. V. 263. P. 231–241.
- Martindale M.Q., Doe C.Q., Morrill J.B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris* // Roux's Arch. Dev. Biol. 1985. V. 194. P. 281–295.
- Schneider S.Q., Bowerman B. b-Catenin asymmetries after all animal/vegetal-oriented cell divisions in *Platynereis dumerilii* embryos mediate binary cell-fate specification // Dev. Cell. 2007. V. 13. P. 73–86.
- Sweet H.C. Specification of the first quartet micromeres in *Ilyanassa* involves inherited factors and position with respect to the inducing D macromere // Development. 1998. V. 125. P. 4033–4044.
- van den Biggelaar J.A.M. Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgate* // J. Morphol. 1977. V. 154. P. 157–186.
- van den Biggelaar J.A.M., Guerrier P. Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgate* // Dev. Biol. 1979. V. 68. P. 462–471.
- Wilson E.B. Experimental studies on germinal localization. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium* // J. Exp. Zool. 1904. V. 1. P. 197–268.

Features of Isolated Blastomeres' Development of the Polychaete *Alitta virens*

R. P. Kostyuchenko* and A. K. Dondua

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Received December 14, 2016

The ability of regulation, including restoration, of the missing parts to normalize the development, is a fundamental characteristic of living systems. However, until recently, representatives of the group Spiralia (animals with spiralian development) have been considered a typical example of determinative development. Meanwhile, studies in recent years give reason to speak about the presence of inductive intercellular interactions at the early stages of Spiralia embryo development. In this paper, for the first time, we have shown the development of the polychaete *Alitta virens* blastomeres isolated at different stages. The results indicate the inability of *A. virens* partial embryos of regulation to form a whole normal larva and a high degree of autonomous determination of trochoblast cells. At the same time, the findings support probable early induction of blastomere *D* and acquisition of competence by blastomere *D* to further development of trochoblast ciliated cells.

Keywords: isolation of blastomeres, the specification of Spiralia cells, cell lineages, trochoblast, cytodifferentiation, trochophore, polychaetes

Сдано в набор 10.01.2017 г.	Подписано к печати 17.04.2017 г.	Дата выхода в свет 23.05.2017 г.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 12.5	Усл. кр.-отт. 0.8 тыс.	Уч.-изд. л. 12.5
	Тираж 59 экз.	Зак. 283	Бум. л. 6.25
		Цена свободная	

Учредители: Российская академия наук,
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
Отпечатано в типографии "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6