

УДК 575.16:591.162

СТЕПЕНЬ ФОРМИРОВАНИЯ СЕРОЗНОЙ ОБОЛОЧКИ В ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛА РАЗВИТИЯ ЗРЕЛОГО ООЦИТА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Х. ЛЯН, В.В. КЛИМЕНКО

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
 Украина, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4
 e-mail: stemway@gmail.com

Цель. Цель данной работы – установить степень развития диапаузирующего зародыша внутри яйца при спонтанном партеногенезе в зависимости от полноты формирования серозной оболочки. **Методы.** Диапаузирующие зародыши изучали на давленных и тотальных препаратах неоплодотворенных яиц. **Результаты.** Степень развития зародыша внутри яйца при спонтанном партеногенезе коррелирует с площадью пигментированной серозы на его поверхности. **Выводы.** За оценку потенциала развития яйца (зрелого ооцита) в выборке партеногенетической диапаузирующей грены тутового шелкопряда можно принять частоту и степень пигментации яиц, которые определяются наличием и полнотой формирования серозной оболочки. Наиболее удобной оценкой потенциала развития зрелого ооцита является частота полностью пигментированных яиц в выборке.

Ключевые слова: тутовый шелкопряд, оогенез, спонтанный партеногенез, диапауза, эмбриогенез, потенциал развития, овогенетическая изменчивость.

Введение. История наблюдения и изучения развития неоплодотворенных яиц, отложенных девственными бабочками-самками домашнего тутового шелкопряда, размножающегося обоеполым путем, исчисляется веками [1]. Это явление, обнаруживаемое в случае полной изоляции самки от самцов, не могло не обратить на себя внимания, так как в норме оплодотворенные яйца моновольтинных пород через 2–3 дня приобретают отчетливую темно-серую окраску и еще через несколько дней входят в диапаузу, а неоплодотворенные яйца, оставаясь непигментированными, гибнут и со временем ссыхаются. В диапаузу яйца уходят на одной стадии развития, и это делает диапаузирующих зародышей весьма удобным объектом биологических исследований [2]. Определенный, зависящий от породы тутового шелкопряда, процент неоплодотворенных яиц обнаруживает в той или иной степени развитую пигментацию и уходит в диапаузу, что является несомненным признаком начавшегося по каким-то причинам, т.е. спонтанного, развития. Лишь в редких случаях из таких затронутых пигментацией неоплодотворенных яиц виргинных самок вылупляются слабые единичные личинки, и наблюдения показывают, что такой способностью обладают только яйца полностью пигментированные.

Со времен ранних эмбриологических исследований на тутовом шелкопряде известно, что пигментация развивающегося яйца обусловлена наличием пигмента в клетках его серозной оболочки, которая в свою очередь представ-

ляет собой остаток бластодермы после от- деления от нее вовнутрь яйца зародыша с амнионом [3, 4]. В случае спонтанного партеногенеза, однако, остается неясным, насколько полно сформировался зародыш даже в случае нормальной серозной оболочки и может ли оказаться правильно сформированный диапаузирующий зародыш внутри яйца с неполно сформированной серозой. Ответ на эти вопросы важен для проводимых в настоящее время исследований по овогенетической изменчивости; в них показано на клонах, получаемых путем термоактивации [1] яиц, сформировавшихся в яичнике при культивировании его в полости тела самца до стадии имаго, изменение потенциала развития зрелых ооцитов вдоль овариолы по морфологическим и физиологическим признакам [5, 6]. В контрольных клонах, без микрохирургии, также было показано различие потенциала развития ооцитов проксимальной и дистальной половин овариолы, если судить по их способности к термоактивации [7]. Понимая под потенциалом развития суммарную способность яйца развиваться под действием любого агента, включая нормальное осеменение сперматозоидом, мы прежде всего оценили его по двум вариантам мейотического партеногенеза, показав, что в случае спонтанного партеногенеза отложенных самок яиц потенциал развития ооцитов падает в направлении от яйцеклада к апексу овариолы [7], а в случае извлеченных из овариол яиц, активированных промораживанием, он падает в обратном направлении [8]. В обоих случаях оценки получены путем определения интенсивности пигментации в изучаемой выборке яиц, другими словами, путем определения доли яиц с наиболее развитой серозной оболочкой. Необходимо было убедиться, что степень развития эмбриона максимальна при полностью сформированной серозе.

Материалы и методы

Ориентировочные опыты в действительности проводились в течение многих лет на разных линиях, породах и гибридах тутового шелкопряда, и именно они послужили основой для высказанного выше предположения о возможности использования степени пигментации серозной оболочки в качестве интегрального показателя способности неоплодотворенного яйца развиваться спонтанно. В настоящей работе исследования проведены большей частью на клоне Р29 [9] и на некоторых новых клонах, выведенных в последние годы.

Изучали пигментацию яиц, отложенных виргинными самками; яиц, извлеченных из овариол неосемененных бабочек по методике Астаурова [1], а также очень редких яиц, оставленных в извлеченных овариолах на продолжительное время для выявления пигментации. В различных вариантах использовали для анализа не менее 20 яиц, чего было вполне достаточно ввиду согласности результатов в пределах каждого случая. Типичные препараты фотографировали (рис. 2) и использовали для составления визуальной сравнительной таблицы.

Для цитологического изучения давленные и тотальные препараты неоплодотворенных яиц получали методом, представленным в ряде публикаций [2, 10].

Результаты и обсуждение

Спонтанный партеногенез яиц в индивидуальных кладках девственных самок клона Р29 имеет характерное распределение, отличающееся от нормального сдвигом в сторону классов с меньшим процентом пигментации и редкостью классов с высоким уровнем пигментированных яиц в кладке (рис. 1). Следует отметить, что характерное для клона распределение спонтанно пропигментировавшихся кладок сохраняется из года в год, что объясняется его генотипической об-

условленностью. Огромная вариация способности к спонтанному партеногенезу неоплодотворенных яиц, отложенных самками с одинаковым генотипом, свидетельствует о многочисленных и зачастую существенных отличиях в их физиологическом статусе, аккумулировавшем в себе к стадии имаго всю жизненную историю особи, а следовательно, и имевшие место особенности оогенеза в каждой из них. Следует отметить, что условия для откладки яиц были одинаковыми для всех неосемененных самок. Таким образом, уровень пигментации в кладке представляет собой вероятность онтогенетического возникновения способности к спонтанному развитию для данной особи в определенных условиях яйцекладки.

Но и при одной вероятности спонтанного развития кладки могут содержать разные доли полностью пигментированных яиц и, соответственно, нормально сформированных зародышей. Доля полностью пигментированных яиц также может быть выражена вероятностью условно нормального развития в случае, если развитие яйца вообще началось. Тем самым потенциал полного спонтанного развития P отдельного яйца в кладке можно оценить по произведению двух рассмотренных вероятностей: S (для условного начала развития, здесь это любая степень пигментации неоплодотворенного яйца) и T (для регистрируемой стадии развития, в нашем случае это стадия диапаузирующего зародыша), то есть $P = ST$. Например, если в кладке неоплодотворенных яиц пигментированных 90%, а из них – полностью 5%, то потенциал полного развития яйца в такой кладке будет равен $P = 0,9 \times 0,05 = 0,045$. Очевидно, что оценка потенциала развития таким способом приложима не только к кладкам, но и к любой выборке яиц, в частности к яйцам, содержащимся в определенном отрезке овариолы имаго. Это потребует более тщательного учета

разных степеней пигментации яиц в изучении потенциала развития и овогенетической изменчивости [7, 11, 12].

Сравнение гистограмм на рис. 1 показывает, что для сравнительного анализа потенциала развития неоплодотворенных яиц разных клонов, пород и линий удобнее использовать данные по кладкам с полностью пигментированными яйцами, поскольку пределы вариации здесь значительно уже. В связи с этим становится весьма важным, действительно ли полностью пигментированные спонтанно партеногенетические яйца содержат зародыши, наиболее близкие к диапаузирующим зародышам оплодотворенных яиц, а яйцам, частично пигментированным, соответствуют недоразвитые в разной степени эмбрионы?

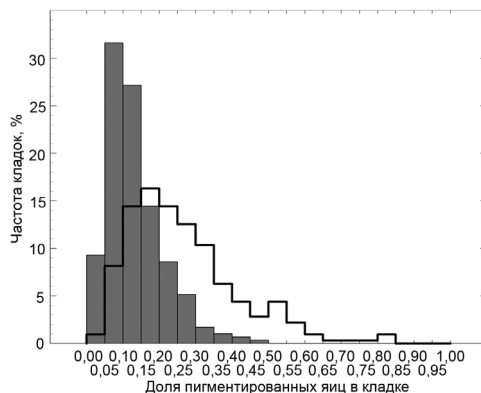


Рис. 1. Пигментация яиц в кладках, отложенных девственными самками клона P29 (из 319 кладок 291 содержала полностью пигментированные яйца; этим кладкам соответствует затемненная гистограмма)

Для цитологического исследования отобрали в диапаузе спонтанно развившиеся яйца с разной степенью пигментации: без пигмента, с пигментацией меньше половины нормальной серозы, с пигментацией больше половины и полностью пигментированные. Этим категориям соответствуют четыре вертикальных ряда на рис. 2. В первом горизонтальном ряду по-

казан внешний вид яиц разных категорий, отобранных из диапаузирующей грены, отложенной неосеменными самками. Во втором ряду показан вид серозной оболочки яйца после удаления с него полупрозрачной твердой скорлупки (хориона); в серозе хорошо различимы крупные клетки, заполненные пигментом. В третьем ряду – окрашенные гематоксилином яйца при слабом увеличении микроскопа

(об.×3,2, ок.×10), из которых затем извлекали зародыш (четвертый ряд). Пятый ряд – цитологические препараты зародышей из предыдущего ряда, на которых заметны более крупные, полиплоидные клетки в зародышах [2]; первым дан препарат непигментированного яйца, причем той его части возле микропиле, где должны были быть видны ядра в случае начавшегося

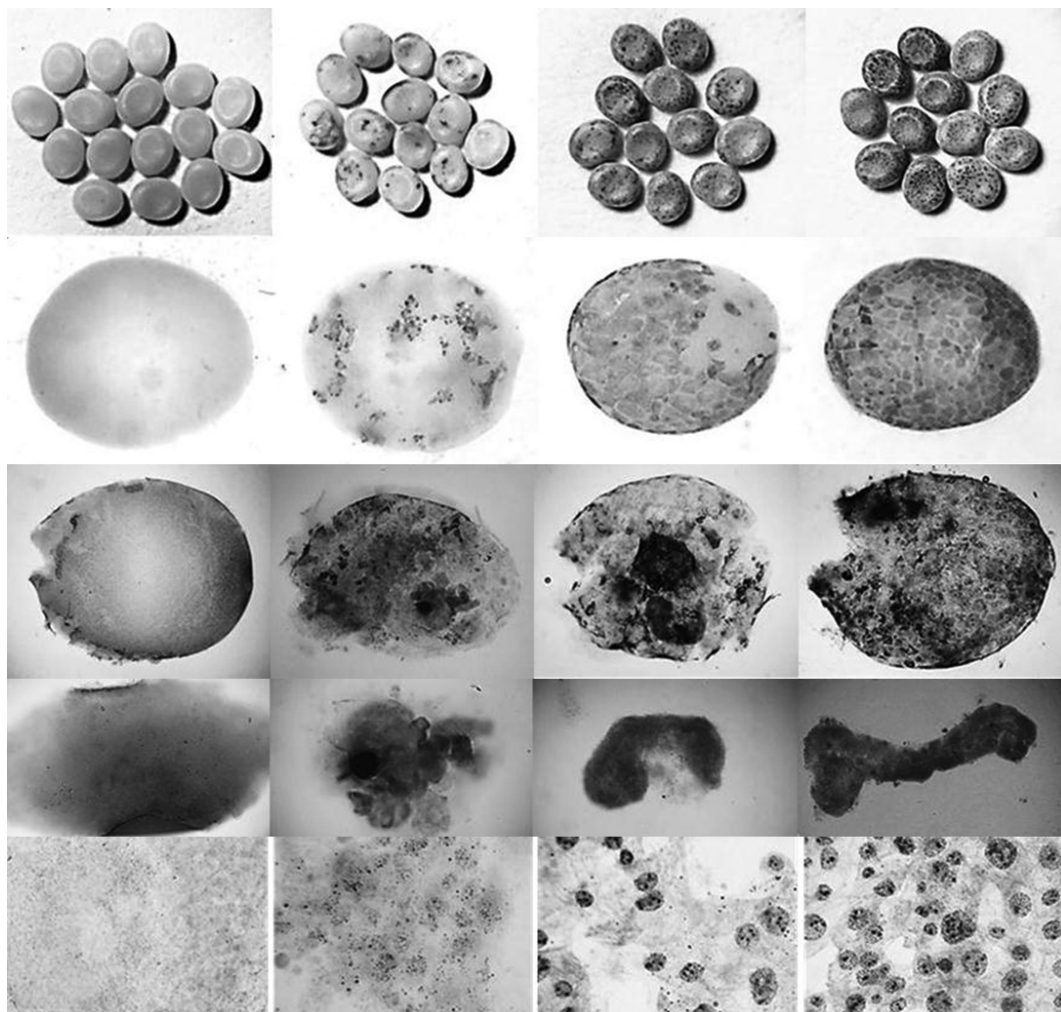


Рис. 2. Соответствие между площадью пигментации серозной оболочки спонтанно развившегося неоплодотворенного яйца и степенью развития в нем зародыша (клон Р29. 1-й ряд – ×12,5; 2-й – ×50; 3-й – ×32; 4-й – ×100; 5-й – ×200)

дробления; однако ядерный материал в данном случае обнаружен не был.

Представленные на рис. 2 результаты фактически оставались одинаковыми для исследованных образцов грены различного спонтанно-партеногенетического происхождения, а именно: для яиц, отложенных, извлеченных из овариолы или оставленных в ней после экстирпации ее из имаго. Они показывают, что степень развития зародыша внутри яйца при спонтанном партеногенезе достаточно хорошо коррелирует с размером пигментированной серозы при выбранном способе оценки. Этот способ фактически уже использован во многих работах по искусственному партеногенезу, где было необходимо сравнить эффект изучаемого физико-химического агента с контролем, которым всегда был спонтанный партеногенез [1]. Однако последний не был прежде использован для оценки потенциала развития зрелого ооцита в оценке обнаруженной в наших исследованиях овогенетической изменчивости [7, 11, 12], для этого понадобился ряд уточнений и подтверждений, первые и самые необходимые из которых приведены в настоящей работе.

Схема проведенного исследования подсказывает будущие уточнения оценки потенциала развития, который пока основан на признаке, легко оцениваемом визуально. Однако можно предвидеть, что изучение эквивалентности зрелых ооцитов потребует более точных оценок уровня развития, в том числе степени полноты серозной оболочки яйца и завершенности формирования зародыша на определенной стадии развития, например на стадии диапаузы. Действительно, биохимическими и молекулярно-генетическими методами можно достаточно точно оценить количество пигмента, содержание вителлогенина, ДНК и РНК, активность ключевых ферментов и т.д. через разные промежутки времени от начала развития, условно

принимая за него момент откладки бабочкой неосемененного яйца или момент извлечения яйца из овариолы, или извлечения самой овариолы из бабочки. И в каждом из этих случаев можно будет использовать для оценки потенциала развития яйца произведение вычисленных аналогичным образом вероятностей достижения двух выделенных определенным способом (методом) состояний спонтанного партеногенетического развития: начального и конечного.

В качестве начального (стартового) состояния особенно важно изучить самые первые стадии спонтанного развития, скрытые пока в непигментированных яйцах. Остается неизвестным, насколько часто метафаза I, характерная для зрелых ооцитов, остается заблокированной до самой гибели яйца, как часто прохождение мейотических делений [13] так и не ведет к началу дробления и образованию бластодермы и т.п. Нельзя также исключить, что в какой-то мере спонтанное развитие характерно для всех яиц ($S = 1$), и тогда в нашем случае частота полной пигментации (T) и будет оценкой потенциала развития до диапаузы: $P = S \times T = 1 \times T = T$. Диапауза не является единственной стадией, на которой удобно регистрировать определенный онтогенетический статус; такими стадиями могут быть вылупление личинок, каждая из линек, вылет имаго, доля фертильных особей и т.п. Соответственно будет несколько меняться и формула произведения вероятностей. Заметим, кстати, что и при работе с оплодотворенной греней, качество которой оценивается прежде всего по выходу личинок (T), формула остается рабочей.

Выводы

Большей продвинутой эмбрионального развития при спонтанном партеногенезе соответствует увеличение площади пигментированной серозы на поверхности

диапаузирующего яйца. За оценку потенциала развития яйца в выборке диапаузирующей грены тутового шелкопряда можно принять частоту в ней яиц с определенной, одинаковой степенью пигментации серозы, зависящей от полноты формирования серозной оболочки. Наиболее удобной оценкой потенциала развития зрелого ооцита в данном участке овариолы (яичника) является частота полной пигментации яиц, развившихся из выборки одинаково локализованных ооцитов.

Список литературы

1. Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240 с.
2. Клименко В.В., Лян Хаююань. Хроматин в диапаузе тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: термический партеногенез и нормальное развитие // Цитология. – 2012. – Т.54, № 3. – С. 218–229.
3. Тихомиров А.А. История развития тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) в яйце // Известия имп. Общества любителей естествознания, антропологии и этнографии. – 1882. – Т.22, вып. 4. – 87 с.
4. Tazima Y. The silkworm: an important laboratory tool. – Tokyo: Kodansha Ltd. – 1978. – 308 p.
5. Zabelina V., Doroshenko K., Klymenko V., Sehna F. Technology of silkworm cloning // Current opinion in Biotechnology. – 2011. – Vol. 22, Suppl. 1. – P. S53.
6. Zabelina V., Lysenko N., Klymenko V., Sehna F. Silkworm parthenogenesis: phenotypic intraclonal variability // 5th Bacsia international conference «Sericulture for multi products – new prospects for development» (Bucharest, Romania, April 11–15, 2011). Bucharest: Institute for Bioengineering, Biotechnology and Environmental Protection – S.C. BIOING S.A. – 2011. – P. 49.
7. Клименко В.В., Забелина В.Ю., Лысенко Н.Г. Внутриклональная изменчивость тутового шелкопряда // Материалы международной молодежной конференции, посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 17–18 ноября 2011, Москва, Россия. Учреждение Российской академии наук, Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН. – М.: Цифровичок, 2011. – С. 161–162.
8. Лысенко Н.Г., Клименко В.В. Отсутствие эквипотенциальности зрелых яиц в овариоле имаго тутового шелкопряда // Вісник УТГіС. – 2013. – Т.11, № 1. – С. 77–84.
9. Астауров Б.Л. Отбор по способности к термическому искусственному партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелковичного червя // Генетика. – 1973. – Т.9, №9. – С.93–106.
10. Клименко В.В. Использование пропионгематоксилина для подсчета клеток в яйцах насекомых // Онтогенез. – 1972. – Т.3, № 3. – С.326–329.
11. Zabelina V., Klymenko V. Ovary transplantation in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient // Sericologia. – 2008. – Issue 48, № 2. – P. 123–128.
12. Лысенко Н.Г. Внутриклональная изменчивость морфологического признака в партеноклоне P5D тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. // Материалы V Международной конференции молодых ученых: «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, 22–25 ноября 2010 г.). – Харьков: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, 2010. – С. 155–156.
13. Клименко В.В., Спиридонова Т.Л. Элиминационный хроматин и искусственный партеногенез у тутового шелкопряда // Цитология. – 1979. – Т.21, № 7. – С.793–799.

Представлена И.А. Козерецкой
Поступила 05.03.2013

СТУПІНЬ ФОРМУВАННЯ СЕРОЗНОЇ ОБОЛОНКИ В ОЦІНЦІ ПОТЕНЦІАЛУ РОЗВИТКУ ЗРІЛОГО ООЦИТУ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА

Х. Лян, В.В. Клименко

Харківський національний університет
імені В.Н. Каразіна
Україна, 61022, Харків, пл. Свободи, 4
e-mail: stemway@gmail.com

Мета. Мета даної роботи – встановити ступінь розвитку зародка, який перебуває у діапаузі, всередині яйця при спонтанному партеногенезі залежно від повноти формування серозної оболонки. **Методи.** Зародки досліджували на давлених і тотальних препаратах незапліднених яєць. **Результати.** Ступінь розвитку зародка всередині яйця при спонтанному партеногенезі корелює з площею пігментації серози на його поверхні. **Висновки.** За оцінку потенціалу розвитку яйця (зрілого ооциту) у вибірці партеногенетичної греди шовковичного шовкопряда у діапаузі можна прийняти частоту і ступінь пігментації яєць, які визначаються наявніс-

тую і повнотою формування серозної оболонки. Найбільш зручною оцінкою потенціалу розвитку зрілого ооциту є частота повністю пігментованих яєць у вибірці.

Ключові слова: шовковичний шовкопряд, оогенез, спонтанний партеногенез, діпауза, ембріогенез, потенціал розвитку, овогенетична мінливість.

DEGREE OF SEROUS MEMBRANE
FORMATION IN EVALUATION
OF DEVELOPMENTAL POTENTIAL
OF THE MATURE OOCYTE IN THE SILKWORM

H. Liang, V.V. Klimenko

V.N. Karazin Kharkiv National University
Ukraine, 61022, Kharkov, Svobody Sq., 4
e-mail: stemway@gmail.com

Aim. The aim of this work is to establish the degree of embryo development inside the diapausing egg upon spontaneous parthenogenesis,

depending on the completeness of the serous membrane formation. **Methods.** The diapausing embryos were studied in squash and total preparations of unfertilized eggs.

Results. The development of the embryo inside the egg during spontaneous parthenogenesis correlated with serosa pigmented area on its surface. **Conclusions.** As an assessment of the developmental potential of an egg (mature oocyte) in a sample of silkworm diapausing unfertilized eggs can be taken the frequency and degree of egg pigmentation, which are determined by the availability and completeness of the serous membrane formation. The most convenient assessment of the development potential of the mature oocyte is frequency of the fully pigmented eggs in the sample.

Key words: *Bombyx mori* L., oogenesis, spontaneous parthenogenesis, diapause, embryogenesis, developmental potential, oogenetic variability.