

ХРОМАТИН В ДИАПАУЗЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.: ТЕРМИЧЕСКИЙ ПАРТЕНОГЕНЕЗ И НОРМАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ

© В. В. Клименко, Лян Хаююань

Биологический факультет Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина, Украина;
электронный адрес: stemway@gmail.com

С помощью окрашивания гематоксилином изучены особенности хроматина диапаузирующих зародышей тутового шелкопряда в нормальном и партеногенетическом развитии. Обнаружили прямое соответствие между числом зерен интерфазного хроматина и числом хромосом в ядре, после чего изучили полиплоидизацию клеток в эмбрионе на стадии диапаузы. Полиплоидизация при партеногенезе не сводится к эндомитотическому удвоению хромосомного набора, поскольку включает в себя 6n-ядра. Для объяснения более разнообразного спектра полиплоидных клеток при партеногенезе (в сравнении с нормой) необходимо учитывать слияние ядер дробления, осуществляемое цитоплазматическим механизмом кариогамии в отсутствие оплодотворения. Впервые на давленных препаратах нами идентифицированы первичные половые (или зародышевые клетки) диапаузирующего эмбриона, характеризующиеся менее компактным хроматином, особенно в зиготическом варианте развития, более крупными размерами ядра и цитоплазмы, нерегулярным числом и размерами ядрышек. Оценка ploидности первичных половых клеток при партеногенезе подсчетом «рыхлых» зерен хроматина в диапаузе возможна и свидетельствует о полиплоидизации в зародышевой линии эмбриона. Это объясняет неизбежную примесь тетраплоидных яиц в грене диплоидных партеноклонов и ее отсутствие при нормальном развитии. Используемый цитологический метод выявил спиральное расположение зерен хроматина на внутренней поверхности ядра на разных уровнях ploидности.

Ключевые слова: интерфаза, гетерохроматин, обоеполое развитие, партеногенез, соматическая полиплоидизация, зародышевая линия, тутовый шелкопряд, полиплоидия, диапауза.

Принятые сокращения: ЗХ — зерна хроматина, ППК — зародышевая, или первичная половая клетка.

Диапауза у тутового шелкопряда имеет место в жизненном цикле моно- и бивольтинных пород. Она удобна для изучения широкого круга вопросов биологии развития и физиологии насекомых. Вхождение в диапаузу оплодотворенных или неоплодотворенных термоактивированных яиц (Астауров, 1940) через 2—3 сут после их активации обусловлено действием гормона диапаузы, вырабатываемого подглоточным ганглием и поступающего в ооциты материнского организма (Hasegawa, 1957; Imai et al., 1991). Частота клеточных делений быстро падает, и в развитии наступает длительный период покоя (до 10 мес) при минимальном уровне метаболизма. Однако диапаузу можно предотвратить, если своевременно обработать развивающиеся яйца соляной кислотой определенной концентрации; в противном случае вошедшая в диапаузу грена вновь приобретает способность развиваться при 25 °С только через 100—120 сут «зимовки» в холодильнике (Tazima, 1978).

Вошедшие в диапаузу зародыши находятся на одной стадии развития, причем клеточный цикл во всех клетках останавливается в интерфазе. Окрашивание фиксированного материала гематоксилином, приготовленным на пропионовой или уксусной кислоте, и раздавливание зародыша в ацетохлоралгидрате позволяют получать давленные препараты со значительно усиленной окраской

ядрышек, гетерохроматина и ядерной оболочки. На таких препаратах было определено в диапаузе количество клеток в зародышах разной ploидности при двух типах репродукции, а именно: при термическом партеногенезе по Астаурову (1940) и при нормальном оплодотворении. Оказалось, что сравниваемые варианты развития существенно различаются, поскольку на одном и том же уровне ploидности количество клеток в зиготических диапаузирующих зародышах почти в 1,5 раза больше, чем в партеногенетических (Клименко, 1974).

В последнее время мы снова обратились к интерфазному гетерохроматину диапаузы для сравнительного изучения полиплоидизации в соме и зародышевой линии эмбрионов, получаемых путем нормального оплодотворения и термического партеногенеза. Регулярность гетерохроматинизации в интерфазных клетках проявляется, в частности, в очевидном сходстве глыбок (зерен) гетерохроматина и их количества в разных ядрах диапаузирующего зародыша.

В настоящей работе, используя в качестве оценки уровня ploидности подсчет зерен хроматина (ЗХ) в ядрах клеток, мы оценили и сравнили процесс полиплоидизации в двух названных выше вариантах развития и выявили его особенности при партеногенезе. Обнаружили также особенности морфологии гетерохроматина в диапау-

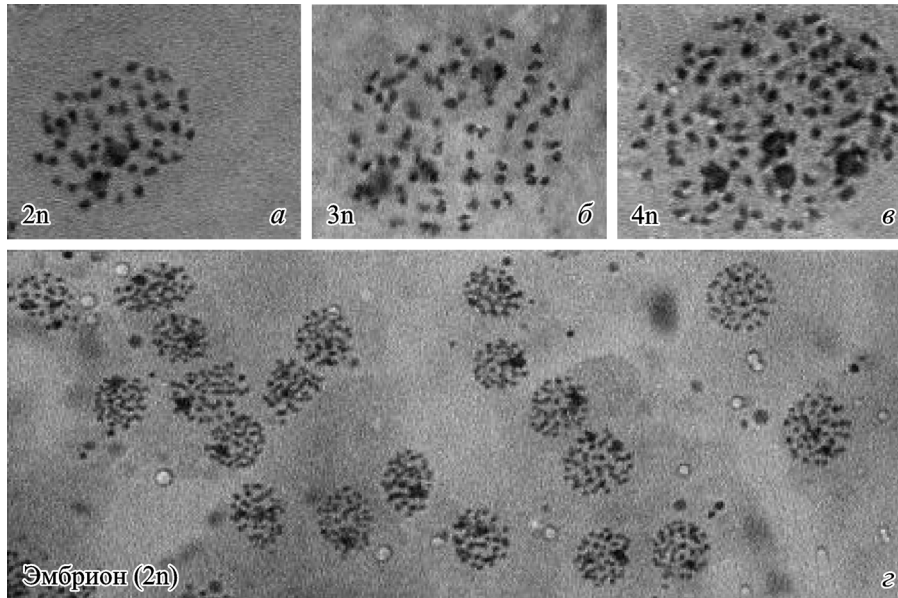


Рис. 1. *a—в* — зерна хроматина и ядрышки в клетках эмбрионов разной ploidyности (2n, 3n, 4n).
д — часть давленого препарата диплоидного зародыша. Об. 100× (*a—в*) и 20× (*д*).

зирующих интерфазных ядрах разных тканей зародыша и его зародышевой линии. Состояние гетерохроматина в этот период отражает не только физиологию диапаузирующего зародыша, но также пространственную организацию ДНК в ядре непосредственно перед вхождением клетки в митоз по окончании диапаузы.

Материал и методика

В работе использовали коллекцию тутового шелкопряда лаборатории зародышевых и стволовых клеток при Харьковском национальном университете им. В. Н. Каразина. Препараты готовили, используя диапаузирующую грену диплоидного клона P29 и тетраплоидного P4n17, выведенных в свое время Астауровым (1968, 1973), а также грену новых триплоидных партеноклонов. Для изучения зиготических зародышей использовали яйца линии С-5, меченной по полу на стадии грены (Струнников, Гуламова, 1960), а также другие лабораторные линии.

Методы фиксации, окрашивания и приготовления давленных препаратов подробно описаны ранее (Клименко, 1972; Щегельская и др., 1986) и успешно проверены на ряде животных и растительных объектов. В качестве красителя использовали гематоксилин (Merck, Германия), приготовленный на уксусной (Смирнов, 1968) или пропионовой (Henderson, Lu, 1968) кислоте; средой для раздавливания окрашенного материала служил ацетохлоралгидрат (Клименко, 1972). Удобство данной методики состоит в том, что даже перекрашенный фиксированный материал, выдержанный в ацетохлоралгидрате достаточное время, можно довести до нужной степени просветления и выделить из него микроглами изучаемый участок зародыша, приобретающий в ацетохлоралгидрате консистенцию, весьма удобную для приготовления однослойных клеточных препаратов. После аккуратного окаймления покровных стекол лаком для ногтей полученные временные препараты могут сохраняться более 1 нед и, как правило, не становятся хуже. Толщину клеточного слоя препарата можно варьировать, подбирая необходимый объем

капли, в которой раздавливается участок зародыша. Для получения тотальных препаратов толстый слой (камеру) получали нанесением пластилина на уголки покровного стекла перед помещением его на каплю ацетохлоралгидрата с изучаемым объектом.

Результаты

Определение ploidyности подсчетом ЗХ в ядре клетки. На тонких давленных препаратах ядра клеток одной ploidyности выглядят одинаковыми по размеру; содержащиеся в них зерна (глыбки) гетерохроматина сходны между собой; часто они лежат раздельно, потому их нетрудно сосчитать. Подсчет ЗХ в ядрах диплоидных зародышей показал, что число зерен на ядро равно диплоидному числу хромосом, которое у домашнего тутового шелкопряда составляет 56. Отклонение от этого диплоидного числа, как правило, составляет несколько зерен, что не может повлиять на оценку ploidyности при гаплоидном наборе хромосом ($n = 28$). Таким же образом мы убедились, что в триплоидных и тетраплоидных зародышах количество ЗХ в ядрах подавляющего числа клеток соответствует триплоидному ($3n = 84$) и тетраплоидному ($4n = 112$) наборам. Удобным критерием правильности оценки уровня полиплоидии является число ядрышек в ядре, которое соответствует числу гаплоидных хромосомных наборов. Ядрышки могут сливаться, тогда уменьшение их числа компенсируется увеличением размеров видимых ядрышек, а суммарный ядрышковый объем остается неизменным. Вариации числа ядрышек в ядре представлены на рис. 1 и 3 на разных уровнях ploidyности.

Представление о вариации интерфазного числа ЗХ в диплоидных, триплоидных и тетраплоидных клетках дают гистограммы, построенные для выборок из 100 клеток зародышей одного уровня ploidyности: модальные классы включают в себя более половины всей выборки, отклонения от основного хромосомного числа незначительны, более часты случаи «недостачи» числа зерен, чем их избыток (рис. 2).

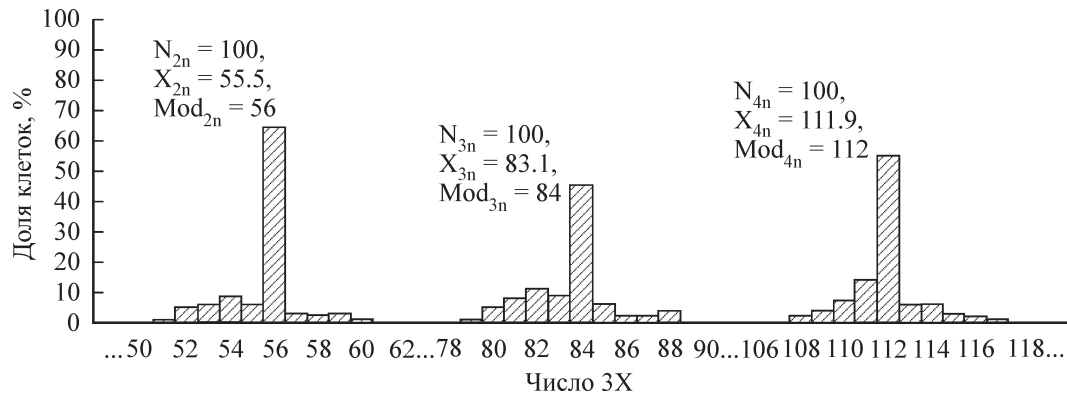


Рис. 2. Распределение клеток эмбриона по числу зерен хроматина (3X) в ядре для ди-(2n), три-(3n) и тетраплоидного (4n) клонов. N_{2n} , N_{3n} и N_{4n} — число клеток в выборке клонов 2n, 3n, 4n соответственно; X_{2n} , X_{3n} и X_{4n} — среднее число 3X на ядро в соответствующей выборке; Mod_{2n} , Mod_{3n} и Mod_{4n} — модальные классы 3X для клонов 2n, 3n, 4n соответственно.

Для определения ploидности зародыша, естественно, достаточно и десятка клеток, а после некоторого опыта хватает и простого взгляда на препарат под микроскопом, чтобы установить по числу 3X, ядрышкам и размеру ядер, отличается ли уровень ploидности изучаемого зародыша от диплоидного. Оценка ploидности таким путем оказывается очень удобной при экспериментальном получении полиплоидов у тутового шелкопряда, точнее, у его моновольтинных и бивольтинных разновидностей, где имеет место диапауза. Количество 3X в ядре, меньшее основного числа, легко объяснимо слипанием зерен или расположением одного под другим, тогда как несколько большее число 3X мы склонны объяснять ско-

рее тем, что видимое зерно может состоять из 2—3 соединенных частей, чем допускать разделение его на отдельные части вследствие раздавливания или предполагать анеуплоидию. Действительно, при окрашивании ацето- или пропионегематоксилином в течение 1 ч при 60 °C хроматин начинает обнаруживать свое более сложное строение. Исходя из одинаковой асимметрии приведенных гистограмм (недостаток зерен встречается чаще их избытка) можно заключить, что маскировка одних зерен другими встречается заметно чаще, чем проявление их составной структуры. Зерна хроматина очень похожи на митогические хромосомы (Астауров, 1968), однако митозы и мейозы на изучаемой стадии отсутствуют, чему со-

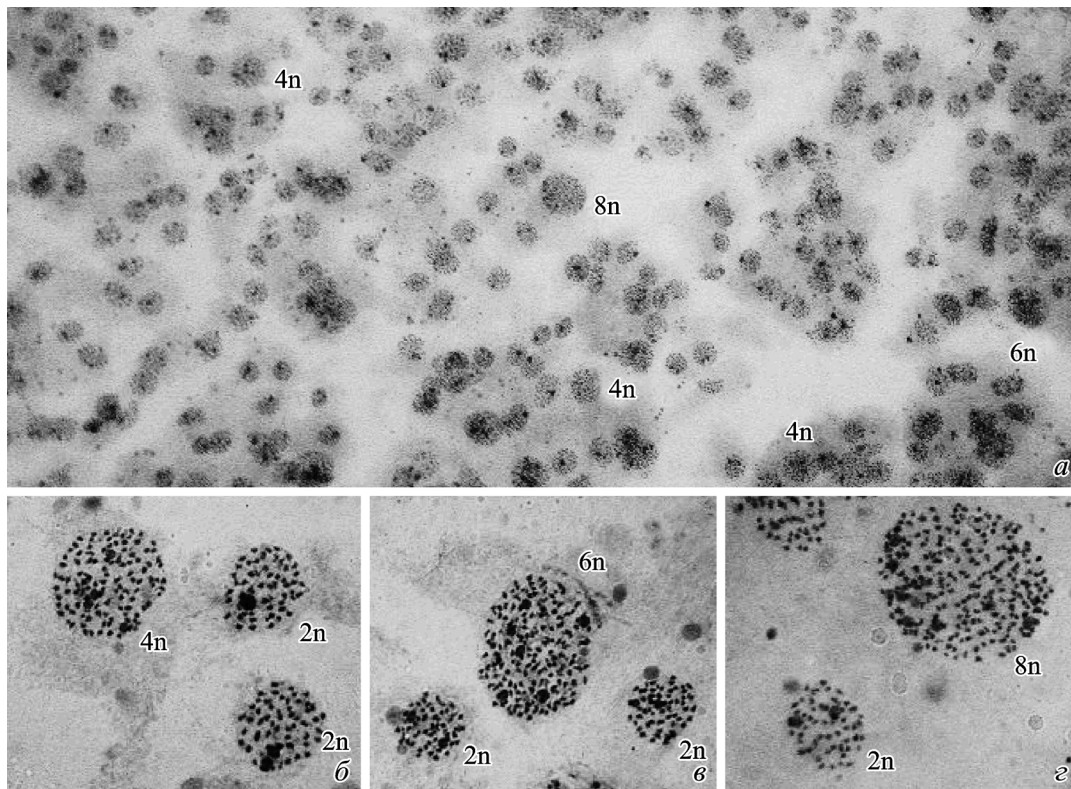


Рис. 3. Давленный препарат диплоидного зародыша партеноклона P29 ($\times 20$), на котором ploидность более крупных клеток (б—з) определена подсчетом зерен хроматина.

Об. 20 \times (а) и 100 \times (б—з).

ответствует наличие в ядрах ядрышек и ядерных оболочек.

Соматическая полиплоидизация в раннем развитии тутового шелкопряда. Известно, что многие органы и ткани насекомых состоят из полиплоидных клеток. Соматическая полиплоидизация начинается еще в эмбриогенезе и в личиночном периоде в отдельных органах, например в шелкоотделительной железе, достигает огромных степеней (Клименко, Спиридонова, 1974). Использованный нами в настоящей работе подход позволил получить представление об этом процессе к моменту полного ухода зародыша в диапаузу. На обзорных препаратах даже при малом увеличении среди основной массы клеток эмбриона хорошо видны более крупные клетки с ядрами большего размера; их плоидность была определена затем подсчетом ЗХ (рис. 3).

Для быстрого сравнения полиплоидизации в партеногенетическом и зиготическом вариантах развития на давленных препаратах оценивали долю полиплоидных клеток в 4 областях зародыша, суммарно вмещающих около 1000 клеток. Для этого эмбрион микроиглами делили на 4 примерно равные части, в которых оценивали полиплоидизацию клеток по ЗХ (табл. 1).

Таким же способом подсчитали полиплоидные клетки в зародыше оплодотворенного яйца (линия ге971), т. е. в зиготическом развитии. Результаты оказались иными: полиплоидные клетки встречались заметно реже (табл. 2).

Более редкая встречаемость полиплоидных клеток в зиготическом варианте развития легко заметна. В 10 дополнительно просмотренных диапаузирующих эмбрионах оплодотворенных яиц нам не удалось найти клетки с плоидностью выше $4n$, да и тетраплоидные клетки в этом варианте развития встречаются реже (ср.: табл. 1 и 2,

Таблица 1

Соматическая полиплоидизация в разных участках диплоидного партеногенетического зародыша (клон Р29)

Плоидность клеток, n	Доля клеток (%) указанной плоидности в области зародыша			
	a (200)	b (250)	v (400)	z (150)
2	98	97	94	96.4
4	2	3	5	3
6	0	0	0.75	0.6
8	0	0	0.25	0

Примечание к табл. 1 и 2. В скобках указан объем выборки клеток зародыша.

Таблица 2

Соматическая полиплоидизация в разных участках диплоидного зиготического зародыша (линия ге971)

Плоидность клеток, n	Доля клеток (%) указанной плоидности в области зародыша			
	a (257)	b (272)	v (791)	z (311)
2	98	98	98.5	98.5
4	2	2	1.5	1.5
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0

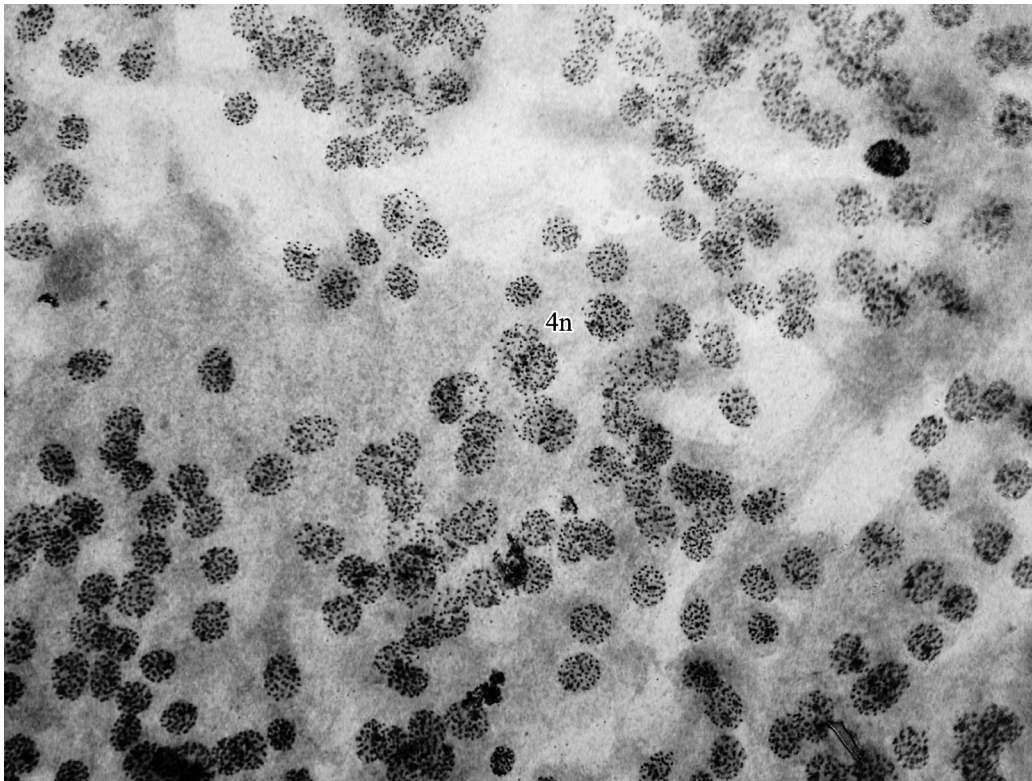


Рис. 4. Типичный препарат диплоидного зиготического эмбриона линии ге971 с двумя тетраплоидными клетками ($4n$) в центре.

Таблица 3

Распределение полиплоидных (6n, 8n) и первичных половых клеток (ППК) вдоль тела диапаузирующего партеногенетического эмбриона (13 зародышей партеноклона P29), поделенного на пять примерно равных частей (a—d)

Эмбрион	Части эмбриона														
	a			б			в			г			д		
	6n	8n	ПК	6n	8n	ПК	6n	8n	ПК	6n	8n	ПК	6n	8n	ПК
1	5	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	6
2	3	3	0	1	1	0	0	1	2	3	2	1	0	0	0
3	4	2	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	6	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0	1	0	6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	2	0	0	0	2	0	2	6	0	0
9	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	0	1	1	8	1	0	8	3	0	0
12	1	0	0	5	0	0	1	2	4	0	0	2	1	6	0
13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0
Σ	26	6	0	8	1	2	3	5	29	9	3	31	12	8	6
Доля, %	44.8	26.1	0.0	13.8	4.4	2.9	5.2	21.7	42.7	15.5	13.0	45.6	20.7	34.8	8.8
Среднее	2.0	0.5	0.0	0.6	0.1	0.2	0.2	0.4	2.2	0.7	0.2	2.4	0.9	0.6	0.5

рис. 3 и 4). Из этого следует предположение, что 6n-клетки, которые не могут возникать путем эндомитотического удвоения хромосомного набора в ядре, образуются только в партеногенетическом развитии. Ввиду важности такого заключения было исследовано целиком 13 партеногенетических зародышей клона P29, каждый из которых для удобства анализа делили на 5 приблизительно равных частей (табл. 3; рис. 5). Число клеток в зародыше на этой стадии составляет около 6000; эта оценка близка к полученной ранее на других диплоидных партеноклонах (Клименко, 1974). Наряду с полиплоидными в табл. 3 включены первичные половые клетки (ППК), о которых речь пойдет ниже; они были обнаружены в количестве от 2 до

16 (в среднем 5—6) во всех эмбрионах, за исключением одного, в котором мы не смогли найти и полиплоидных клеток (эмбрион 7). В эмбрионе 5 также не было обнаружено полиплоидных клеток, однако в секторе г мы нашли 7 первичных половых клеток. Следует отметить, что ППК наиболее часто встречаются в секторах в и г (около 90 % от их общего количества), но не обнаруживаются в головном секторе а. Октоплоидные клетки более часто встречаются в секторах а, в и особенно д (34.8 %). Распределение гексаплоидных клеток сдвинуто в сторону головного отдела эмбриона, и около 60 % их общего числа находится в секторах а и б. К этому остается добавить, что в параллельно изученных 19 диплоидных зиготических зароды-

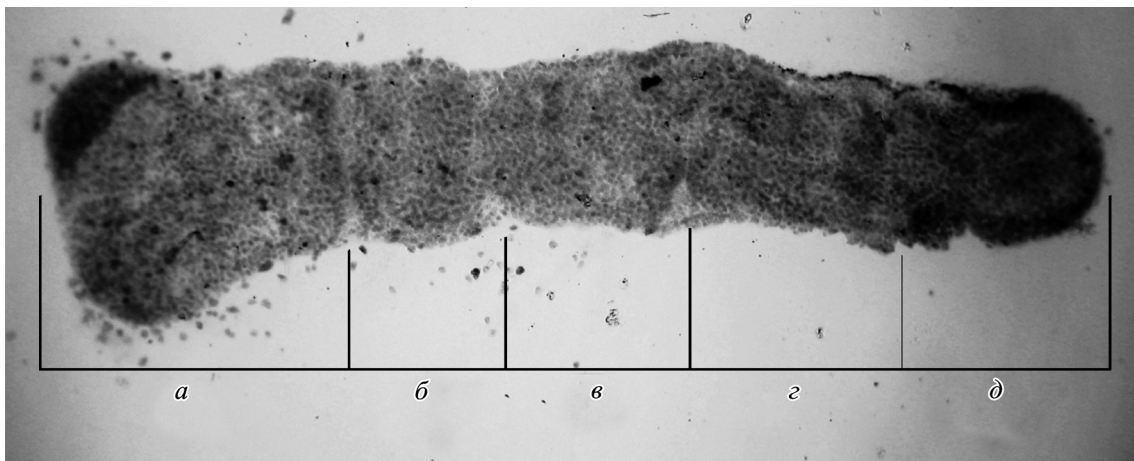


Рис. 5. Эмбрион партеноклона P29 в диапаузе.

Показано пять областей, в которых подсчитывали полиплоидные и зародышевые клетки для табл. 3. Об. 10×.

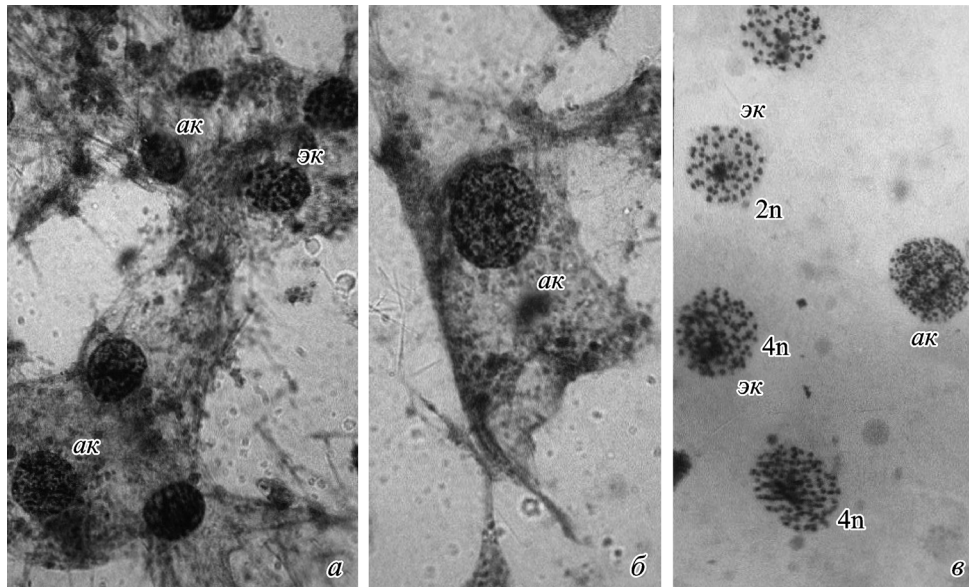


Рис. 6. Амниотические клетки (ак) и крупнозернистые эмбриональные клетки (эк) из разных препаратов.

a, б — несколько перекрашенные препараты, на которых выявляются однослойная амниотическая мембрана и мелкозернистость хроматина в ядрах ее клеток; *в* — нормальный препарат для сравнения хроматина в амниотической клетке (ак) и эмбриональных клетках (эк) 2n и 4n. Об. 40× (*a*) и 100× (*б, в*).

шах мы не смогли обнаружить ни гексаплоидных, ни октаплоидных клеток. Довольно обычные на этой стадии развития тетраплоидные клетки в зиготическом варианте встречаются реже, чем в варианте партеногенетическом, хотя ранее было показано, что клеток в диапазирующих эмбрионах в первом случае достоверно больше, чем во втором (Клименко, 1974).

Более частая полиплоидизация клеток партеногенетического эмбриона по сравнению с зиготическим, очевидно, является следствием действия дополнительного механизма возникновения полиплоидных клеток, свойственного именно партеногенезу. Наличие 6n-клеток в теле эмбриона заставляет предположить, что таким механизмом является слияние ядерного материала двух (2n + 4n) или трех (2n + 2n + 2n) соседних клеток в ходе эмбрионального развития. Следствием этого предположения должно быть наличие в грене диплоидных партеноклонов не только тетраплоидных яиц, которые были обнаружены еще Астауровым (1940), но и гексаплоидных яиц, которые пока не выявлены в диплоидных клонах, скорее всего потому, что по размеру они не отличаются от диплоидных и встречаются гораздо реже тетраплоидных.

Внезародышевые клетки. Внезародышевые клетки возникают в результате обособления эмбриона от бластодермы и остальных клеток внутри яйца (вителлофагов). Остающаяся на поверхности яйца часть бластодермы дает начало однослойной серозной оболочке, тогда как другая ее часть, отходящая внутрь яйца вместе с эмбрионом и смыкающаяся над ним, образует однослойную амниотическую оболочку. Клетки, не принадлежащие названным оболочкам и эмбриону, называют вителлофагами; к диапаузе ядра вителлофагов оказываются в центре желточных сфер, заполненных глобулами желтка.

Ядра амниотических клеток плоские, по размерам они чаще крупнее ядер диплоидных клеток эмбриона (рис. 6); встречаются среди них и клетки, ядра которых превосходят тетраплоидные ядра эмбриона (рис. 6: амниотические клетки (*б, в*) в сравнении с клетками эмбриона 2n и 4n). Во всех случаях 3X амниотических ядер заметно

мельче 3X в эмбриональных клетках; связь их числа с плоидностью пока не изучена.

Если не учитывать крупные размеры клеток серозы и обесцветить в них пигмент так же, как при рецессивной мутации w_2 в гомозиготном состоянии (рис. 7, *з*), то они становятся очень похожими на клетки амниона (по мелкозернистости хроматина в их ядрах и по возникающей в связи с этим трудности определения плоидности по числу 3X). Сходство в морфологии 3X можно рассматривать как подтверждение их происхождения из одного источника — бластодермы, не вошедшей в состав эмбриона. Распределение пигмента в клетках серозы и положение ядра в них представляют интерес для оценки физиологического состояния грены в ходе диапаузы. Заметим, что пигментация серозной оболочки может быть темно-серой, фиолетовой, красной, зеленовато-серой или вовсе отсутствовать, как в случае мутации, использованной в настоящей работе (рис. 7, *з*).

Ядра вителлофагов, занимающие в диапаузе центр желточных сфер, заслуживают отдельного изучения: хроматин в них организован нерегулярно, они могут фрагментироваться, причем характер и степень фрагментации варьируют. Ядра вителлофагов — отдельный вопрос, заслуживающий более тщательного исследования (рис. 8).

Зародышевые клетки. Отдельной задачей данной работы был поиск первичных половых клеток (ППК) в диапазирующем зародыше. Судя по гистологическим препаратам японских исследователей, на стадиях, наиболее близких к диапаузе, ППК отличаются от соматических клеток не только размерами, но и структурой ядра и цитоплазмы (Miyu, 1958). Клетки, отличающиеся от всех, приведенных выше, были найдены нами в районе *в* диапазирующего зародыша и идентифицированы как ППК (табл. 1). Для этих клеток характерен значительно более крупный размер как цитоплазмы, так и ядра; однако в данном случае больший размер ядра соответствует скорее не большей плоидности, а более активному состоянию хроматина, поскольку последний декомпактизирован в значительно большей степени, чем в клетках соматиче-

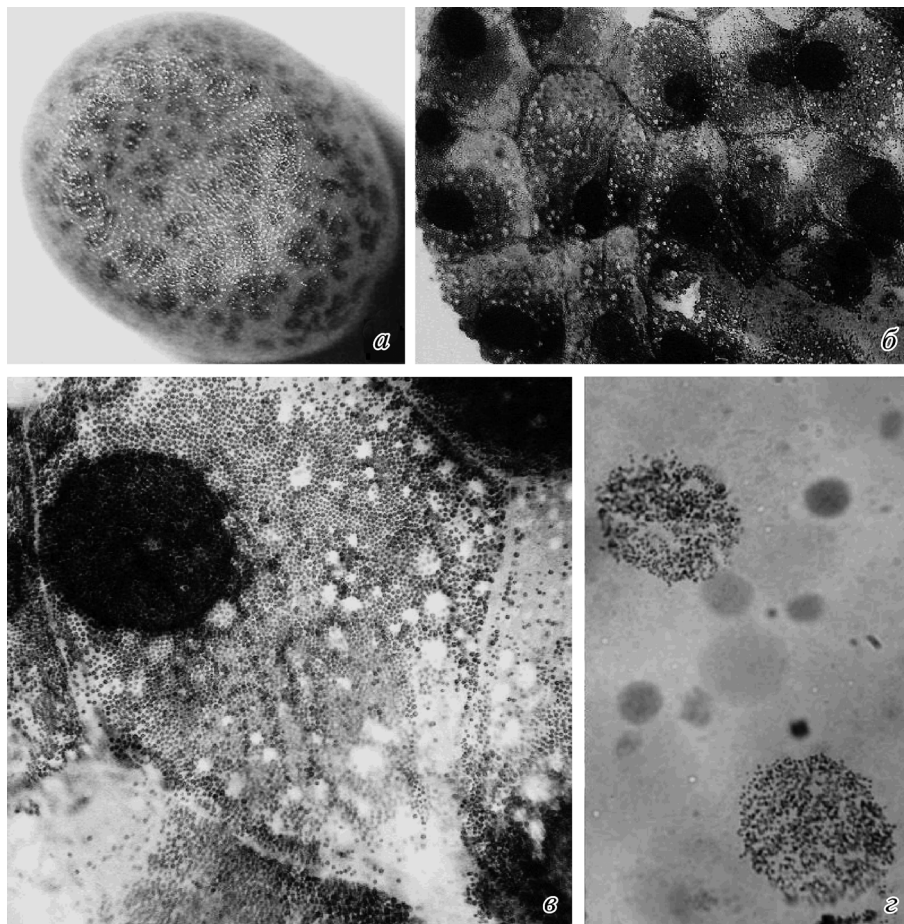


Рис. 7. Клетки серозной оболочки под хорионом яйца без окраски (а) и окрашенные (б, в).
 с — мелкозернистый хроматин ядер серозной оболочки линии С-5, лишенной вследствие мутации пигмента в серозе яйца. Об. 100× (б, в).

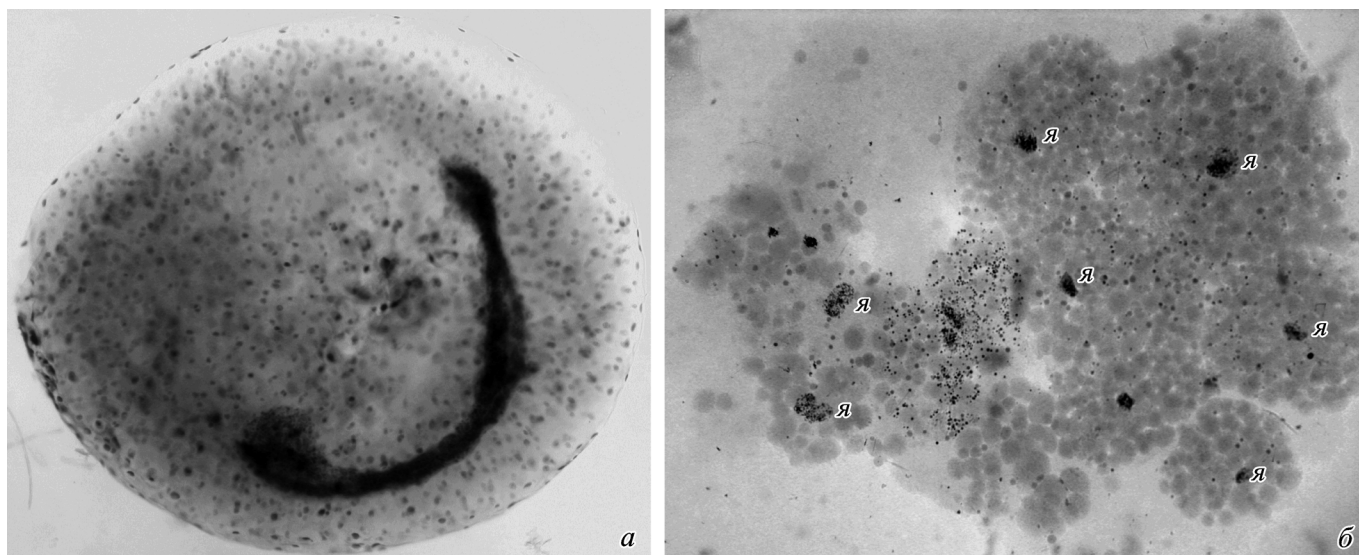


Рис. 8. Тотальный препарат яйца тузового шелкопряда, освобожденного от хориона, окрашенного ацетогематоксилином и просветленного в ацетохлоралгидрате.
 а — зародыш внутри яйца в окружении желточных сфер (об. 3×); б — желточные сферы при большем увеличении (об. 40×), центр желточной сферы вителлофага занят ядром (я), форма которого очень варьирует.

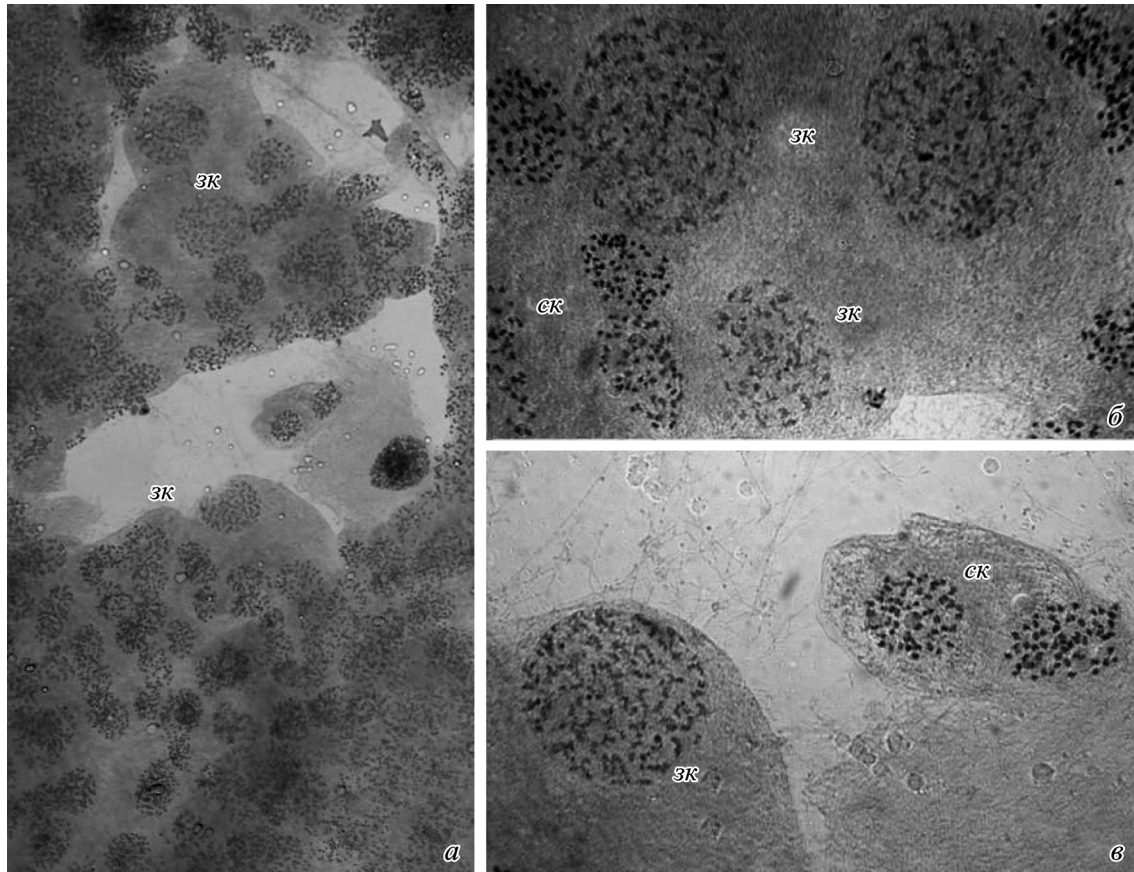


Рис. 9. Зародышевые клетки (ЗК) среди соматических (СК) в партеногенетическом эмбрионе клона P29.

a, б — зародышевые клетки различаются по размеру ядер; *в* — «рыхлые» зерна хроматина у ЗК, количество которых можно оценить, сравнивая с хроматином соматических 2n-клеток. Об. 40× (*a*) и 100× (*б, в*).

ских. Вследствие этого определение ploидности подсчетом ЗХ серьезно затруднено, а то и просто невозможно. Более активному состоянию хроматина ППК соответствуют и более крупные ядрышки, чаще неодинаковых размера и плотности, в количестве от 1 до 3 или больше, но тогда более мелких; можно предположить, что в этих клетках имеют место как слияние, так и фрагментация первоначального числа ядрышек в ядре. Хотя ППК были обнаружены и в партеногенетическом (рис. 9), и в зиготическом (рис. 12) материале, нетрудно было заметить, что в случае зиготического материала декомпактизация хроматина ППК в диапаузе более выражена, чем в партеногенетическом развитии.

Мы попытались оценить количество ЗХ, напоминающих, скорее, частично деспирализованные хромосомы, в зародышевых клетках изученных партеногенетических эмбрионов (рис. 9). Распределение 60 ППК по числу декомпактизированных ЗХ (рис. 10) подтверждает наличие среди них тетраплоидных клеток (рис. 9), что вполне соответствует неизбежной примеси тетраплоидных яиц в грене диплоидных партеноклонов (Клименко, Спиридонова, 1977). Подобный анализ в зиготическом варианте оказался невозможным из-за гораздо более дисперсного состояния хроматина зародышевых клеток в этом случае, что очевидно из данных рис. 11.

Распределение ЗХ в ядре. Закономерное распределение ДНК хромосом в объеме ядра на разных стадиях клеточного цикла вряд ли более удивительно, чем случайное происхождение жизни, однако неожиданное и

простое подтверждение неслучайного расположения хромосом (хроматина) в ядре, найденное нами в диапаузирующем зародыше тутового шелкопряда, лишнее подтвердило наше убеждение в том, что закономерное регулярное распределение генетического материала в ядре является необходимым условием его функционирования. Давленные препараты могут быть разной толщины. В более толстом слое между предметным и покровным стеклами ядра клеток сохраняют свою сферическую форму, а расположение ЗХ в объеме ядра наиболее близко к прижизненному. В пространственной организации хроматина диапаузы обнаруживается спиральность. В этом можно легко убедиться, просматривая в последовательных оптических срезах «удачно» ориентированные (рис. 12) или

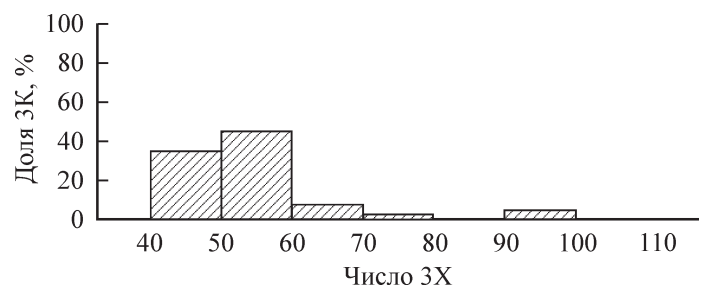


Рис. 10. Распределение зародышевых клеток (ЗК) партеногенетических эмбрионов по количеству декомпактизированных зерен хроматина (ЗХ) на 1 ядро (N = 60).

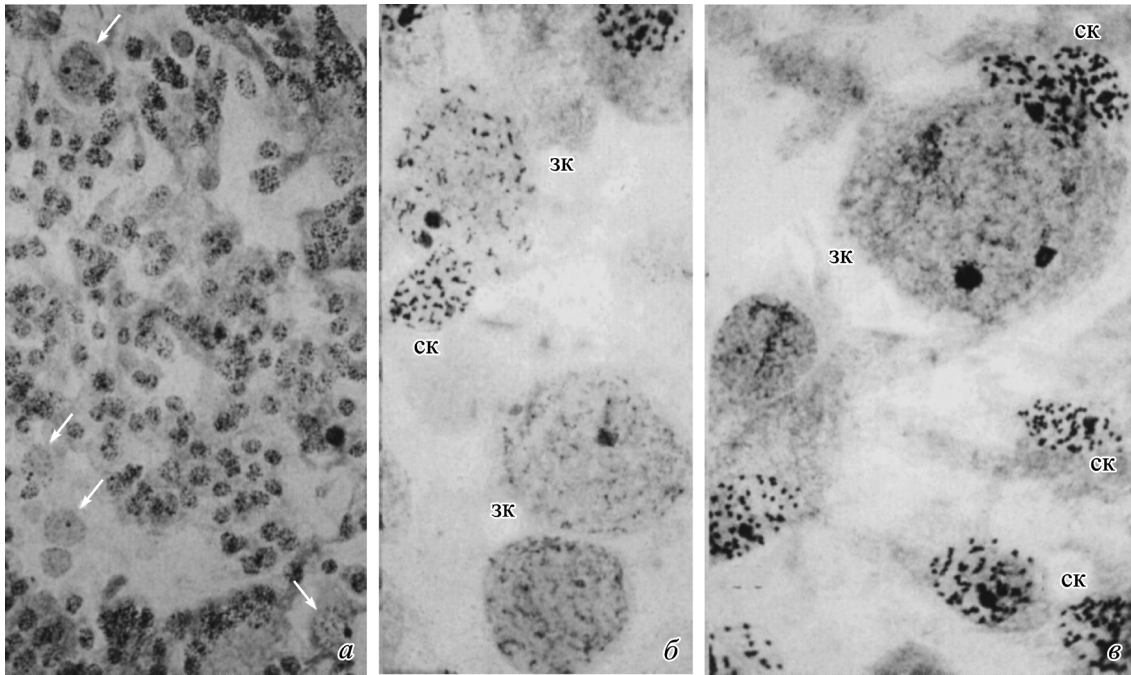


Рис. 11. Зародышевые клетки (зк, *стрелки*) среди соматических (ск) в зиготическом эмбрионе линии ge971 при увеличении объектива 20× (а) и 100× (б, в).

Клетки зк выделяются размерами ядра и цитоплазмы, мелкодисперсным хроматином и огромными ядрышками; ядра ск легко определяются по компактному хроматину и круглым ядрышкам одинакового объема.

«удачно» раздавленные ядра. В последнем случае спиральность показана в диплоидном ядре, в котором ось спирали перпендикулярна плоскости препарата (первое ядро); второе и третье ядра подтверждают наличие спиральности на триплоидном и соответственно тетраплоидном уровнях (рис. 13).

Обращает на себя внимание не только спиральное расположение ЗХ на внутренней поверхности ядра от одного полюса к другому. Можно заметить, что на достаточно протяженных участках спирали (ее обрывках), возникающих при раздавливании ядра, зерна одинаковой

формы и одного размера расположены рядом. Мы считаем, что обнаруженные особенности состояния хроматина (ДНК) не только свидетельствуют о закономерном расположении его в объеме ядра, но одновременно предоставляют исследователям удобный объект для более глубокого изучения проблемы пространственной организации ДНК в интерфазном ядре современными методами микроскопии и молекулярной биологии (Стегний, 2011).

Напрашивается предположение о том, что вдоль хроматиновой спирали гомологичные хромосомы, представ-

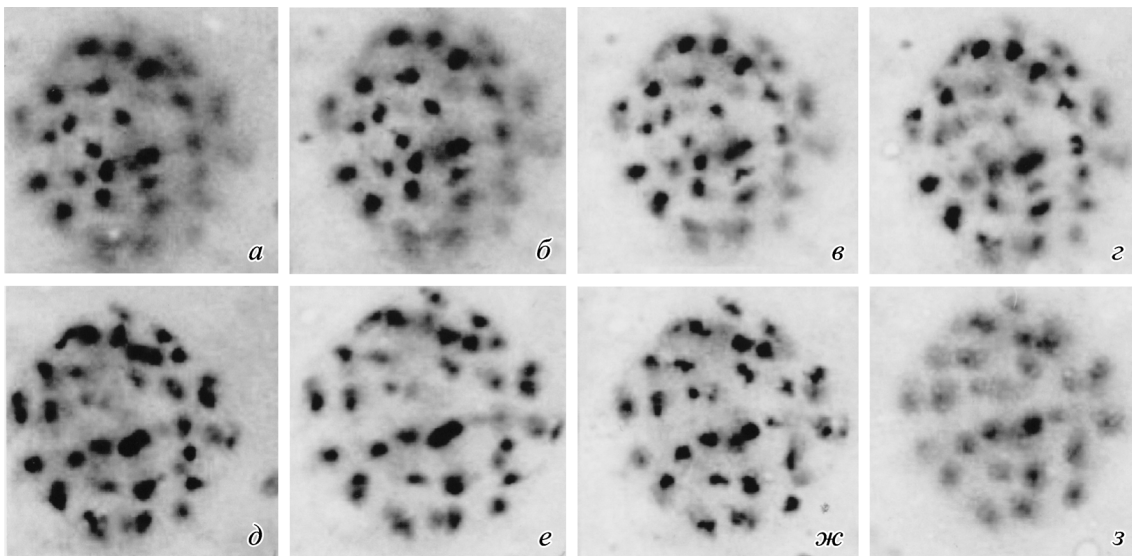


Рис. 12. Спиральное расположение зерен хроматина в ядрах диапаузирующего эмбриона клона P29 на последовательных оптических срезах (а—з).

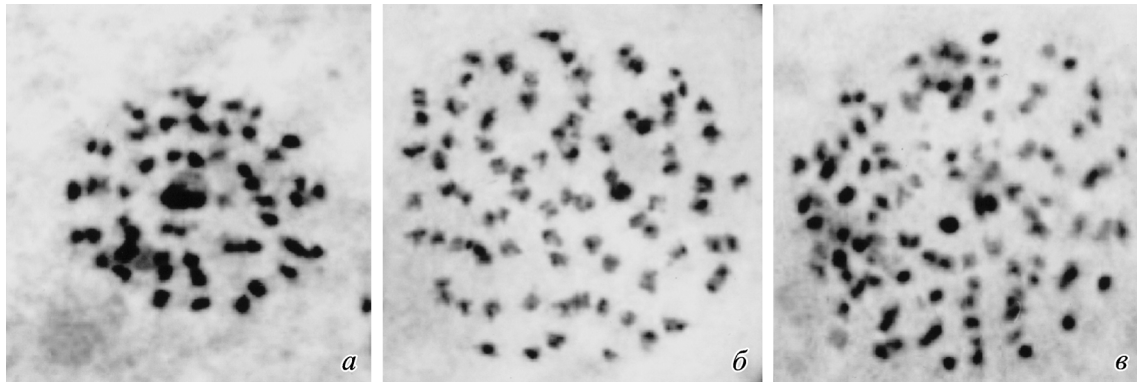


Рис. 13. Спиральное расположение зерен хроматина в диапаузе на диплоидном (а), триплоидном (б) и тетраплоидном (в) уровнях.

ленные ЗХ, лежат рядом одна за другой. Соседнее расположение гомологов, вероятно, сохраняется и на более высоких уровнях плоидности, однако при этом вероятность «укладки» сравнимых конфигураций трех и более последовательных зерен в плоскость давленного препарата, очевидно, уменьшается (рис. 12). Механизмы гетерохроматинизации хромосом и спиральной укладки гетерохроматиновых зерен по внутренней поверхности ядра в соматических и зародышевых клетках при вхождении зародыша тутового шелкопряда в диапаузу нам неизвестны.

Обсуждение

Обнаруженное в настоящей работе тесное соответствие между плоидностью клетки диапаузирующего зародыша и числом ЗХ в клеточном ядре (рис. 1, 2) позволяет исследовать процессы полиплоидизации, которые, вероятно, начинаются еще в период дробления и прекращаются вместе с митотическими делениями, когда зародыш впадает в диапаузу. Полученные данные показывают, что возникновение клеток $4n$ на изученном отрезке развития происходит заметно чаще в партеногенетическом, чем в зиготическом, развитии; больше того, в первом случае в зародыше обнаруживаются еще и клетки более высоких уровней плоидности — $6n$ и $8n$.

Если появление октаплоидных клеток легко объяснить двумя последовательными циклами эндомитоза, то для возникновения клеток $6n$ требуется иной механизм. Мы предполагаем, что таким дополнительным специфическим для партеногенеза механизмом является слияние ядер в процессе дробления, вызываемое, по-видимому, теми же факторами, которые в нормальном (зиготическом) развитии обуславливают кариогамиию. Заложенный в цитоплазме зрелого неоплодотворенного яйца механизм кариогамии при термическом партеногенезе сохраняется, накладывается на процесс дробления диплоидного женского пронуклеуса (Клименко, 2001) и приводит с определенной вероятностью к слиянию сначала диплоидных ядер дробления, а потом — и к вторичным ядерным объединениям. Через слияние ядер клетки $6n$ могут возникнуть двумя путями: при тройном слиянии $2n + 2n + 2n$ или при вторичном слиянии $2n + (2n + 2n)$; дополнительные тетраплоидные и октаплоидные клетки партеногенетического зародыша могут возникать аналогичным образом. В пользу сохранения механизма кариогамии при партеногенезе свидетельствует тот факт, что почти половина гексаплоидных клеток (табл. 3) образуется в головной ча-

сти зародыша, т. е. в том районе цитоплазмы, где в норме происходит кариогамия (Tazima, 1978).

Нельзя исключить того, что часть возникающих полиплоидных ядер со временем оказывается в области формирования зародышевых клеток и может приводить к появлению полиплоидных яиц в грене партеногенетических клонов. Действительно, тетраплоидные яйца были обнаружены в диплоидных клонах вскоре после открытия партеноклонирования (Астауров, 1940), а гексаплоидные ооциты были выявлены в триплоидных клонах при выведении обоеполой тетраплоидной расы тутового шелкопряда (Астауров, 1968). В настоящей работе полиплоидизация ППК диплоидных клонов нашла прямое подтверждение (рис. 10); однако для выявления клеток $6n$ в зародышевой линии при термипартеногенезе необходимо значительно большее количество исследованных зародышей в диапаузе. В любом случае различия процессов полиплоидизации в партеногенетическом и зиготическом вариантах преддиапаузного развития представляются нам достаточно существенными и далеко идущими, если экстраполировать полиплоидизацию через слияние ядер на естественный партеногенез (Клименко и др., 2011).

Другим аспектом, в котором рассматриваемые два варианта развития существенно различаются, является морфология хроматина в зародышевых и соматических клетках эмбриона (рис. 9, 11). Во-первых, более активное состояние генетического материала в зародышевой линии по сравнению с соматическими клетками (судя по выраженной декомпактизации хроматина) оказалось для нас фактом неожиданным и интригующим. Во-вторых, было очевидно, что в случае оплодотворения декомпактизация хромосом заходит значительно дальше, чем в случае партеногенеза. Физиологическое значение более активного состояния зародышевых клеток в эмбрионе во время диапаузы и в том и в другом вариантах остается неясным.

В обоих вариантах развития в соматических клетках зародыша обнаружено расположение ЗХ одного за другим так, что они образуют спираль на внутренней поверхности ядра (рис. 12, 13). Необходимы более тонкие исследования современными методами, чтобы выяснить, соединены ли чем-то соседние ЗХ или они занимают преддетерминированные позиции в архитектонике ядерной оболочки. На основе микроскопического изучения мы склонны предполагать, что гомологичные зерна, т. е. глыбки гетерохроматина одинаковой формы, располагаются на спирали рядом даже у полиплоидных форм (рис. 13). Имеет ли здесь место только право- или только левозакрученная спираль или встречаются обе спирали?

Как связана спиральность диапаузного хроматина с расположением хромосом в метафазных пластинках митоза и мейоза, с пространственным распределением хромосомной ДНК в интерфазных активно работающих ядрах диплоидных и полиплоидных (шелкоотделительная железа) клеток, а также в диапаузирующих ядрах полиплоидных клеток внезародышевых оболочек. Где из-за мелкозернистости хроматина плоидность пока не установлена (рис. 6, 7)?

Если у соматических ядер в диапаузе ДНК организована в виде спирали, на которой гомологичные зерна, составляющие, по-видимому, часть гомологичных хромосом, находятся рядом и следуют друг за другом «цугом», то в метафазе I мейоза как диплоидов, так и тетраплоидов гомологичные хромосомы располагаются попарно на «ленте» синаптомемального комплекса друг против друга (Клименко, Спиридонова, 1979). Возможно, что организация ДНК и хроматина в ядрах клеток сомы и зародышевой линии существенно различается на одних и тех же стадиях развития (рис. 9, 11). Однако в зародышевой линии, как и в соматических клетках, проходит митоз, и если ему предшествует соседнее расположение гомологов, то оно может сохраниться и в митотической метафазной пластинке, что доступно цитологической проверке. Переход к мейотической организации ДНК происходит, видимо, в интерфазе, предшествующей профазе мейоза; в метафазе II мейоза два гомолога представлены только у тетраплоидов тутового шелкопряда (Астауров, 1968) и их взаимное расположение также доступно для анализа (Стегний, 2011).

Проведенное исследование имеет и прикладное значение, поскольку включает в себя достаточно простой метод определения плоидности потомства, которое получают в экспериментальной генетике и селекции, когда применяют различные способы обработки гены с целью индукции полиплоидии (Клименко, Спиридонова, 1982). Ушедший в диапаузу экспериментальный материал можно без спешки проанализировать представленным в этой работе методом и получить надежную оценку эффективности примененного способа получения полиплоидов у тутового шелкопряда.

Список литературы

- Астауров Б. Л. 1940. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 240 с.
- Астауров Б. Л. 1968. Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. М.: Наука. 102 с.
- Астауров Б. Л. 1973. Отбор по способности к термическому искусственному партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелковичного червя. Генетика. 9 (9) : 93—106.
- Клименко В. В. 1972. Использование пропionoгематоксилина для подсчета клеток в яйцах насекомых. Онтогенез. 3 (3) : 326—329.
- Клименко В. В. 1974. О количестве клеток в диапаузирующих зародышах разной плоидности тутового шелкопряда. Онтогенез. 5 (4) : 357—362.
- Клименко В. В., Лян Хаюань, Прохорова Е. А., Тигунцова А. Е. 2011. Экспериментальные триплоиды тутового шелкопряда и происхождение естественной полиплоидии у бисексуальных животных. В кн.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. 11 : 65—68.
- Клименко В. В., Спиридонова Т. Л. 1974. Об относительной степени эндополиплоидизации клеток шелкоотделительной железы диплоидов и триплоидов шелковичного червя. Онтогенез. 5 (1) : 83—86.
- Клименко В. В., Спиридонова Т. Л. 1977. Трансплоидная комбинативная изменчивость при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда. ДАН СССР. 236 (3) : 740—743.
- Клименко В. В., Спиридонова Т. Л. 1979. Элиминационный хроматин и искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. Цитология. 21 (7) : 793—799.
- Клименко В. В., Спиридонова Т. Л. 1982. Полиплоидия и партеногенез у тутового шелкопряда. Изв. АН СССР. Сер. биол. хим. наук. 4 : 32—36.
- Смирнов Н. А. 1968. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых. Цитология. 10 (12) : 1601—1602.
- Струнников В. А., Гуламова Л. М. 1960. Искусственная регуляция пола у тутового шелкопряда. Сообщение I. Выведение меченных по полу пород тутового шелкопряда. Генетика. 5 (6) : 53—71.
- Стегний В. Н. 2011. Пространственная организация хромосом в ядре. Эпигенетические и эволюционные аспекты. В кн.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. 10 : 73—78.
- Щегельская Е. А., Спиридонова Т. Л., Клименко В. В. 1986. Методы цитологического анализа профазы мейоза у тутового шелкопряда. Изв. АН МССР. Сер. биол. хим. наук. 1 : 67—70.
- Hasegawa K. 1957. The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori* L. Nature. 179 : 1300 — 1301.
- Henderson S. A., Lu B. V. 1968. The use of haematoxylin for squash preparations of chromosomes. Stain Technol. 43 : 233—236.
- Imai K., Konno T., Nakazawa Y., Komiya T., Isobe M., Koga K., Goto T., Yaginuma T., Sakakibara K., Hasegawa K., Yamashita O. 1991. Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad. 67 (B) : 98—101.
- Klymenko V. V. 2001. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L. : problems and prospects. J. Insect Biotechnol. Sericology. 70 : 155—165.
- Miya K. 1958. Studies on the embryonic development of the gonad in the silkworm *Bombyx mori* L. I. Differentiation of germ cells. J. Fac. Agric. Iwate Univ. 3 : 436—467.
- Tazima Y. (Ed.). 1978. The silkworm: an important laboratory tool. Tokyo: Kodansha. 307 p.

Поступила 12 IX 2011

CHROMATIN IN DIAPAUSE OF THE SILKWORM *BOMBYX MORI* L.:
THERMAL PARTHENOGENESIS AND NORMAL DEVELOPMENT*V. V. Klymenko, Liang Haoyouan*Department of Biology, V. N. Karazin Kharkov National University, Ukraine;
e-mail: stemway@gmail.com

Having used hematoxylin as a stain, some features of silkworm embryo chromatin in diapause have been studied in normal and parthenogenetic development. With found direct correlation between the number of interphase chromatin grains and the number of chromosomes in the nucleus, we examined cell polyploidization in the embryo at diapause stage. Polyploidization by parthenogenesis is not reducible to endomitotic doubling of the chromosome set because it comprises 6n-nuclei. Explanation of more diverse range of polyploid cells in parthenogenesis needs to consider the fusion of cleavage nuclei that is carried out by the cytoplasmic karyogamic mechanism in the absence of fertilization. For the first time on squash preparations, in diapausing embryo, we have identified primary germ cells (PGC) that are characterized by less compact chromatin, especially in the zygotic form of development, a larger size of the nucleus and cytoplasm, and irregular number and size of nucleoli. Evaluation of PGC ploidy in parthenogenesis by calculation of «loose» chromatin grains in diapause is possible and testifies polyploidization in embryo germ-line. This explains the inevitable admixture of tetraploid eggs in diploid parthenoclone grain and its absence in normal development. Cytological method used has revealed a spiral arrangement of chromatin grains on the inner surface of the nucleus at different levels of ploidy.

Key words: interphase, heterochromatin, bisexual development, parthenogenesis, somatic polyploidization, germ-line, silkworm, polyploidy, diapause.
